



# **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Medicina**

**Escuela Profesional de Tecnología Médica**

## **Eficacia del ensayo inmuno-enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (Deli) y ensayo de fluorescencia para malaria basado en el reactivo SYBR green-I (MSF) para calcular la IC<sub>50</sub> de drogas anti-Plasmodium falciparum. Iquitos 2015**

### **TESIS**

Para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica

### **AUTOR**

Maribel Liliana TELLO SÁNCHEZ

### **ASESOR**

Lic. Pilar Fernanda ALVA BETALLELUZ

Lima, Perú

2019



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Tello, M. Eficacia del ensayo inmuno-enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (Deli) y ensayo de fluorescencia para malaria basado en el reactivo SYBR green-I (MSF) para calcular la IC50 de drogas anti-Plasmodium falciparum. Iquitos 2015 [Tesis]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Medicina, Escuela Profesional de Tecnología Médica; 2019.

---

## HOJA DE METADATOS COMPLEMENTARIOS

Código Orcid del autor (dato opcional):

Código Orcid del asesor: 0000-0002-2271-9345

DNI del autor: 44144851

Grupo de investigación: Grupo HEPATO

Institución que financia parcial o totalmente la investigación: Naval Medical Research Unit Six (**NAMRU-6**)

Ubicación geográfica donde se desarrolló la investigación. Debe incluir localidades y coordenadas geográficas: Puesto de Salud Padre Cocha del distrito de Punchana, provincia de Maynas, región Loreto, ubicada a 3°41'37.8"S 73°16'17.8"W.

Año o rango de años que la investigación abarcó: 2015



Universidad Nacional Mayor de San Marcos  
Universidad del Perú, Decana de América  
Facultad de Medicina  
Escuela Profesional de Tecnología Médica



"AÑO DE LA LUCHA CONTRA LA CORRUPCIÓN E IMPUNIDAD"

**ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS**

Conforme a lo estipulado en el Art. 113 inciso C del Estatuto de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (R.R. No. 03013-R-16) y Art. 45.2 de la Ley Universitaria 30220. El Jurado de Sustentación de Tesis nombrado por la Dirección de la Escuela Profesional de Tecnología Médica, conformado por los siguientes docentes:

Presidente: Mg. Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo  
Miembros: Mg. William Renee Cornejo Medina  
Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas  
Asesor : Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz

Se reunieron en la ciudad de Lima, el día martes 20 de agosto 2019, procediendo a evaluar la Sustentación de Tesis, titulado **"EFICACIA DEL ENSAYO INMUNO-ENZIMÁTICO DE DETECCIÓN DE LA ENZIMA LACTATO DESHIDROGENASA (DEL) Y ENSAYO DE FLUORESCENCIA PARA MALARIA BASADO EN EL REACTIVO SYBR GREEN-I (MSF) PARA CALCULAR LA IC50 DE DROGAS ANTI-Plasmodium falciparum. IQUITOS 2015"** para optar el Título Profesional de Licenciado en Tecnología Médica en el Área de Laboratorio Clínico y Anatomía Patológica de la señorita:

**MARIBEL LILIANA TELLO SÁNCHEZ**

Habiendo obtenido el calificativo de:

17

(en números)

Diecisiete

(en letras)

Que corresponde a la mención de: *Muy bueno*

Quedando conforme con lo antes expuesto, se disponen a firmar la presente Acta.

*Rubén Valdivieso Izquierdo*

Presidente

Mg. Lázaro Rubén Valdivieso Izquierdo

*William Renee Cornejo Medina*

Miembro

Mg. William Renee Cornejo Medina

*Miguel Hernán Sandoval Vegas*

Miembro

Dr. Miguel Hernán Sandoval Vegas



*Pilar Fernanda Alva Betalleluz*

Asesor (a) de Tesis

Lic. Pilar Fernanda Alva Betalleluz

## **Descargo de Responsabilidad**

Las opiniones y afirmaciones contenidas en este proyecto son propias de la autora y no deben interpretarse como posición oficial o que reflejan la opinión del Ministerio de Marina, Ministerio de Defensa ni de ninguna otra agencia del gobierno de los Estados Unidos.

Este proyecto se ha desarrollado como parte del protocolo de investigación NAMRU6.2007.0004 que ha sido aprobado por el Comité de Ética de NAMRU-6 y financiado por GEIS 847705.82000. 256B. B0016.

Dedicado  
A Dios por darme salud y apoyo espiritual y a  
mis amados padres, por  
la dedicación y esfuerzo que realizaron  
para brindarme una educación y  
por ser la motivación para mi  
superación profesional y personal.

## **Agradecimientos**

Al Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos – NAMRU-6 con mención especial al departamento de Parasitología por hacer posible la realización de esta tesis y financiar todos los insumos, equipos, instalaciones y personal necesario para culminar este estudio.

A todo el personal del departamento de Parasitología de NAMRU-6 por haberme apoyado y por todo lo que aprendí en él, así mismo, por haberme dado su voto de confianza y por todo el apoyo otorgado a mi persona.

Un agradecimiento especial al Dr. Christian Baldeviano, Dr. Andrés Lescano y Mg. Lorena Tapia y Dra. Carmen Lucas por su invaluable apoyo y confianza para la realización de esta tesis.

A mi asesora, la Lic. Pilar Alva Betalleluz por su paciencia, apoyo y confianza en mí como persona y en mi trabajo de tesis. Gracias por sus consejos personales y buen criterio para redactar. Gracias por escucharme y por su apoyo en cada momento.

A la Magister Bertha Carrión por ayudarme, orientarme y motivarme para sustentar mi trabajo de tesis.



## **ABREVIATURAS**

ACT: terapia combinada con artemisinina

AL: artemeter+lumefantrina

AQ: amodiaquina

AR: artesunato

ART: Artemisinina

AS+AQ: artesunato+amodiaquina

CL: clindamicina

CQ: cloroquina

CV: coeficiente de Variación

DELI: por sus siglas en inglés Double –site Enzyme-Linked lactate dehydrogenase Inmuno detección

DHA-PIP: dihidroartemisinina-piperaquina

dsADN: ácido desoxirribonucleico de cadena doble

ELISA: son las siglas en inglés Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FP: protoporfirina

HRP-2: por sus siglas en inglés Histidine Rich Protein-2 o proteína 2 rica en histidina.

IC50: concentración inhibitoria media máxima

LDH: Enzima Lactato Deshidrogenasa

LUM: lumefantrina

MSF: ensayo de fluorescencia para Malaria basado en el reactivo SYBR Green-I

MQ: mefloquina

NAMRU-6: Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos

OD/DO: densidad óptica

PIP: piperaquina

PQ: primaquina

PYR: pirimetamina

QN: quinina

QNX: quinacrina

RFU: unidades de fluorescencia relativa

R2: Coeficiente de determinación de curvas

ssADN: ácido desoxirribonucleico de cadena simple

SP: sulfadoxina-pirimetamina

TET: tetraciclina

TMB: tetrametilbencidina

WHO/OMS: Organización Mundial de la Salud

## ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MÉTODOS.....	22
1. TIPO DE INVESTIGACIÓN.....	23
2. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	23
3. POBLACIÓN .....	23
4. MUESTRA Y MUESTREO.....	23
5. VARIABLES .....	25
6. TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS.....	27
7. PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS .....	27
8. CONSIDERACIONES ÉTICAS .....	29
III. RESULTADOS. ....	30
IV. DISCUSIÓN. ....	43
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES. ....	49
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
ANEXOS.....	57

## LISTA DE TABLAS

Tabla N°1. Porcentaje de éxito del cálculo de las IC50 de las drogas CQ, QN y MQ según ensayos DELI y MSF.

Tabla N°2. Coeficiente de determinación de curvas ( $R^2$ ) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF

Tabla N°3. Evaluación de diferencias de los coeficientes de determinación de curvas ( $R^2$ ) entre los ensayos DELI y MSF mediante la prueba de Wilcoxon

Tabla N°4. Evaluación de diferencias de valores de CV entre los ensayos DELI y MSF mediante la prueba de McNemar

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico N°1. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con el ensayo de sensibilidad *in vitro* DELI: Ensayo de inmuno detección Doble-Enzima Lactato Deshidrogenasa.

Gráfico N°2. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con el ensayo de sensibilidad *in vitro* MSF: Ensayo de fluorescencia para Malaria basado en el reactivo SYBR Green-I.

Gráfico N°3. Porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* según ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF.

Gráfico N°4. Porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* según drogas.

Gráfico N°5. Coeficientes de determinación de curva (R2) de CQ, QN y MQ del ensayo DELI según nivel de parasitemia.

Gráfico N°6. Coeficientes de determinación de curva (R2) de CQ, QN y MQ del ensayo MSF y según nivel de parasitemia.

Gráfico N°7. Frecuencias de coeficientes de variación de RFU para el ensayo MSF.

Gráfico N°8. Frecuencias de coeficientes de variación de DO para el ensayo DELI.

Gráfico N°9. Comparación de los porcentajes de CV positivos con los ensayos MSF y DELI.

Gráfico N°10. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* según ensayo DELI y nivel de parasitemia.

Gráfico N°11. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* según ensayo MSF y nivel de parasitemia.

Gráfico N°12. Porcentajes del éxito del cálculo de la IC50 de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF en parasitemias bajas.

## **LISTA DE IMÁGENES**

Imagen N° 1. Provincia de Maynas en el departamento de Loreto.

Imagen N° 2. Distrito de Punchana en la provincia de Maynas.

Imagen N° 3. Las 7 comunidades del distrito de Punchana.

## RESUMEN

**INTRODUCCIÓN:** La malaria causada por *Plasmodium falciparum* es el tipo de paludismo que produce más casos graves constituyendo un importante problema de salud pública en Latinoamérica. El tratamiento antimalárico es un factor importante en la lucha contra la malaria, sin embargo, la constante resistencia a drogas que ha ido desarrollando *P. falciparum* es un problema que se enfrenta día a día en las zonas endémicas del Perú. Con el fin de evaluar la sensibilidad a drogas antimaláricas se han desarrollado pruebas de sensibilidad *in vitro* como la prueba MSF, basado en la detección del ADN usando SYBR Green I y la prueba DELI, basada en la detección de la enzima pLDH específica, siendo esta última prueba la más específica hasta ahora y la que ha demostrado una mayor sensibilidad para detectar parasitemias tan bajas como 0.005% en comparación con la prueba MSF que detecta parasitemias desde 0.05%. Sin embargo, en el Perú no hay estudios que comparen la eficacia del cálculo de la IC50 de ambos ensayos. **OBJETIVO:** Determinar la eficacia de las pruebas DELI y MSF para calcular la IC50 de drogas antimaláricas mefloquina, quinina y cloroquina obtenidas de aislamientos de *P. falciparum* provenientes de pobladores de la comunidad de Padre Cocha en Iquitos-Perú. **DISEÑO METODOLÓGICO:** Se realizó un estudio cuantitativo descriptivo, prospectivo de corte transversal. La muestra fueron 16 muestras de sangre con diagnóstico de malaria confirmado por gota gruesa. Se realizaron los dos ensayos de sensibilidad *in vitro* (DELI y MSF) a cada muestra. Se determinaron tres factores de eficacia para el presente estudio: porcentaje de éxito, coeficiente de determinación de curva (R2) y coeficiente de variación (CV). Se hizo un análisis descriptivo y estadístico de los factores de eficacia mediante las pruebas de Wilcoxon y McNemar-Bowker para muestras pareadas con  $p < 0.05$ . **RESULTADOS:** Las medias aritméticas de los valores de IC50 con el ensayo DELI fueron para cloroquina 231.26 nM, quinina 101.17 nM y mefloquina 16.03 nM. Las medias de los valores de IC50 con el ensayo MSF fueron para cloroquina 227.52 nM, quinina 142.46 nM y mefloquina 35.07 nM. El porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 para las tres drogas fueron el 50% (8/16) y 87.5% (14/16) en los ensayos MSF y DELI respectivamente, estas diferencias fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo, en el análisis entre los porcentajes de éxito entre drogas, no presentaron diferencias para CQ y QN y si presentaron diferencias para MQ ( $p < 0.05$ ). No hay diferencias significativas entre los valores de R2 entre las pruebas MSF y DELI. El porcentaje de éxito de CV positivos aumentó de 37.5% con el ensayo MSF a



81.25% con el ensayo DELI, estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ).

**CONCLUSIÓN:** Se concluye que el ensayo DELI es más eficaz que el ensayo MSF para calcular la IC<sub>50</sub> de las drogas CQ, QN Y MQ. **PALABRAS CLAVE:** Pruebas de Sensibilidad Parasitaria, Concentración 50 Inhibidora, eficacia, *Plasmodium falciparum*.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** Malaria caused by *Plasmodium falciparum* is the one that produces more severe cases that can be lethal, creating a deadly public health problem in Latin America. The antimalarial treatment is an important component in the fight against malaria; nevertheless, the continuous resistance to drugs that *Plasmodium falciparum* has developed is a problem that is faced every day in the endemic areas of Peru. To evaluate sensitivity to antimalarial drugs, *in vitro* sensitivity assays have been developed, such as the MSF assay, based on DNA detection using SYBR green I; and the DELI assay, based on the detection of the specific pLDH enzyme, the latter assay is the most specific so far, it has also shown greater sensitivity in order to detect parasitemias as low as 0.005% as compared to the MSF assays which detects from 0.05%. However, there are no studies comparing the efficacy of the IC<sub>50</sub> calculation of both assays in Peru. **OBJECTIVE:** To determine the efficacy of the DELI and MSF assays to calculate the IC<sub>50</sub> of antimalarial drugs mefloquine, quinine and chloroquine obtained from isolates of *P. falciparum* from the community Padre Cocha residents in Iquitos, Peru. **METHODOLOGICAL DESIGN:** A quantitative-descriptive, prospective slitting cross-sectional study was carried out. There were 16 blood samples with malaria diagnosis confirmed by thick blood smear. The two *in vitro* sensitivity assays (DELI and MSF) were performed on each sample. Three factors of effectiveness were determined for the present study: success rate, Coefficient of determination curve (R<sup>2</sup>) and coefficient of variation (CV). A descriptive and statistical analysis of effectiveness factors was carried out using Wilcoxon and McNemar-Bowker tests for paired samples with  $p < 0.05$ . **RESULTS:** The arithmetic averages of the IC<sub>50</sub> values with the DELI assay were for Chloroquine 231.26 nM, Quinine 101.37 nM and Mefloquine 16.03 nM. The averages of the IC<sub>50</sub> values with the MSF assay were for Cloroquine 227.52 nM, Quinine 142.46 nM and Mefloquine 35.07 nM. The success rates on the IC<sub>50</sub> determination for the three drugs were of 50% (8/16) and 87.5% (14/16) in the MSF and DELI assays respectively, the difference between this rates was statistically significant ( $p < 0.05$ ). However, in the analysis between the percentages of success between drugs, there were no differences for CQ and QN and there were differences for MQ ( $p < 0.05$ ). There were no significant differences between R<sup>2</sup> values between the MSF and DELI assays. The success rate of positive CVs increased from 37.5% with the MSF assay to 81.25% with the DELI assay, these differences were

significant ( $p < 0.05$ ). **CONCLUSION:** It is concluded that the DELI assay has a better efficacy than the MSF assay in order to calculate the IC<sub>50</sub> of CQ, QN and MQ drugs. **KEY WORDS:** Parasitic Sensitivity Tests, Inhibitory Concentration 50, Efficacy, *Plasmodium falciparum*.

# **CAPITULO I**

## **INTRODUCCIÓN**

## 1.1 DESCRIPCIÓN DE LOS ANTECEDENTES

La constante resistencia a drogas que ha desarrollado *P. falciparum* es un grave problema de Salud Pública en zonas endémicas del Perú. Por tal motivo, el monitoreo de la sensibilidad a drogas antimaláricas es una herramienta indispensable para vigilar los cambios de la sensibilidad a drogas antimaláricas en el tiempo.

Existen dos formas de evaluar la sensibilidad a drogas antimaláricas, mediante pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro*. La prueba “Gold Standard” para estudios de eficacia del tratamiento antimalárico, con la que se puede evaluar la sensibilidad a la droga durante el tratamiento, es la prueba *in vivo*. Si bien esta prueba provee importante información que se correlaciona directamente con la sensibilidad del parásito a la droga suministrada, también está sujeta a error en el conteo de parásitos por parte del profesional de salud y toma mucho tiempo obtener un resultado (entre 14 a 28 días) (1). Además, generalmente es aplicable para evaluar sensibilidad a la primera o segunda línea de tratamiento antimalárico y no para evaluar nuevos medicamentos (2). Por otra parte, la prueba *in vivo* por su naturaleza mide la interacción entre el parásito y el paciente, por lo cual los resultados se ven afectados principalmente por la respuesta inmunológica del paciente, por lo tanto, los resultados de la prueba no necesariamente reflejan la sensibilidad real al antimalárico (1).

Por las desventajas que presenta la prueba de sensibilidad *in vivo*, actualmente se ha estado utilizando la prueba de fluorescencia para Malaria basada en el reactivo SYBR Green-I (MSF, del inglés Malaria SYBR Green I-based Fluorescence) para estudios de vigilancia de resistencia a drogas antimaláricas, ya que no es laboriosa y es de fácil implementación, sin embargo, la prueba presenta mucha lectura residual de fondo afectando la interpretación de los resultados y su especificidad (3). Por otro lado, el ensayo *in vitro* HRP2 (del inglés histidine-rich protein II) es una prueba inmunoenzimática que detecta la producción de la proteína-2 rica en histidina producida por el parásito en su desarrollo y multiplicación, el cual es un indicador de crecimiento del parásito y de la inhibición por drogas antimaláricas. Esta última prueba detecta muy bajas parasitemias como 0.01%, sin embargo su principal desventaja es que la incubación de la muestra puede tardar hasta 72h para obtener porcentajes de éxito cercanos al 100%

(4). Asimismo, el ensayo DELI (del inglés Double-Site Enzyme-Linked lactate dehydrogenase Immunodetection) es una prueba enzimática que detecta la enzima lactato deshidrogenasa del parásito *P. falciparum*, producida durante el crecimiento, utilizado como indicador para evaluar la sensibilidad del parásito a las drogas antimaláricas. La prueba DELI en varios estudios presenta una alta sensibilidad, detectando parasitemias tan bajas como 0.005%. Además, los resultados de la IC50 del ensayo DELI se correlacionan con el ensayo Microtest, utilizado para calcular el porcentaje de maduración de esquizontes en diferentes concentraciones de drogas antimaláricas, pero tiene la desventaja de ser un ensayo muy laborioso (5).

Todos los estudios publicados hasta la fecha coinciden en la alta especificidad y sensibilidad de la prueba DELI detectando parasitemias de 0.005%, mientras que otras pruebas solo detectan parasitemias mayores a 0.2% (6); además, en investigaciones desarrolladas en Francia en el 2006, Kaddouri y col. (7), reportan la alta reproducibilidad y concordancia de los resultados de la prueba DELI con los resultados de la prueba isotópica (por radioisótopos), y su principal ventaja es la simplicidad para realizarse en campo.

En el 2001, los países de la región juntamente con la Organización Mundial de la Salud (OMS) crearon la Red Amazónica de la Vigilancia de la Resistencia a los Antimaláricos (RAVREDA-AMI), con el objetivo de monitorear la eficacia y resistencia a los antimaláricos en el contexto epidemiológico actual, y facilitar a los países la información de todas las herramientas disponibles para el monitoreo de la sensibilidad de *P. falciparum*. En este documento se registraron sensibilidades del ensayo DELI, los cuales se compararon con las pruebas más usadas en la actualidad como la prueba HRP2, y resaltaron la alta sensibilidad y especificidad que presentó el ensayo DELI (8).

El presente estudio se planteó la siguiente pregunta: ¿Cuál de las pruebas DELI o MSF es más eficaz para calcular la IC50 de drogas anti *-P. falciparum* en cepas de la comunidad Padre Cocha, Iquitos?

## 1.2 IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACIÓN

Desde el año 2001, el Perú adoptó la terapia combinada con derivados de ART (MQ+AS) como primera opción de tratamiento en áreas de la Costa Norte del país, donde *P. falciparum* es resistente a SP, y también como primera línea de tratamiento en la Amazonia Peruana, donde la resistencia a CQ y SP está ampliamente distribuida (9, 10). En el tratamiento combinado, la MQ, con su acción residual, cumple un papel muy importante dando protección de una posible resistencia a AS usado en el tratamiento combinado (11). Considerando que MQ cumple un rol importante para prevenir o retrasar la aparición de cepas de *P. falciparum* resistentes a AS, es importante realizar una vigilancia epidemiológica de la sensibilidad a MQ.

Se evaluó la eficacia del cálculo del IC50 de CQ a pesar de que existe resistencia a CQ en el área de estudio y actualmente CQ no forma parte del tratamiento de malaria por *P. falciparum* en la Amazonia Peruana, ya que el presente estudio no tiene como finalidad determinar sensibilidad o resistencia a drogas antimaláricas sino determinar la eficacia del cálculo del IC50 independientemente si se trata de cepas de *P. falciparum* sensibles o resistentes a CQ, por lo tanto la resistencia a CQ en el área de estudio no resta importancia al estudio. Por otro lado, también se incluyó a CQ como un control de resultados de sensibilidad a esta droga, porque se espera que todas las muestras sean resistentes a CQ, y susceptibles a MQ y QN.

Asimismo, el antimalárico QN es una droga alternativa que se usa como segunda línea de tratamiento en la Costa Norte y la Amazonia Peruana, donde exista resistencia a la terapia combinada (10). Por lo tanto, sería también importante vigilar la sensibilidad a QN, una de las principales drogas de segunda línea, para tener registros que aún se mantiene la sensibilidad a esta droga y pueda ser usada en cualquier momento.

El departamento de Loreto es el lugar con mayor incidencia de malaria por *P. falciparum* en el Perú, además, es una área con una fuerte presión de selección por ser limítrofe con países como Brasil, Colombia y Ecuador donde también se utiliza la terapia combinada, por lo que es importante vigilar la sensibilidad a drogas en esta área (12). Algunos investigadores ya han notificado cepas resistentes de *P. falciparum* a MQ en

Paragominas, Brasil (13), así como investigadores peruanos han comunicado la necesidad de reactivar un sistema de vigilancia de la resistencia de MQ en el Perú (14).

Por lo tanto, bajo la necesidad de realizar estudios de vigilancia epidemiológica de la sensibilidad de drogas antimaláricas como MQ y QN, se fundamentó la necesidad de comparar la eficacia de las pruebas *in vitro* DELI y MSF para el cálculo de la IC50.

### **1.3 OBJETIVOS:**

#### **1.3.1 OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Determinar la eficacia de las pruebas DELI y MSF para calcular la IC50 de drogas antimaláricas mefloquina, quinina y cloroquina obtenidas en aislamientos de *P. falciparum* provenientes de pobladores de la comunidad de Padre Cocha en Iquitos-Perú.

#### **1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Determinar el porcentaje de éxito del cálculo de IC50 según ensayos MSF y DELI y según drogas.
- ✓ Calcular el coeficiente de determinación de curvas (R<sup>2</sup>) de los valores de IC50 de ambos ensayos según parasitemia.
- ✓ Comparar los coeficientes de variación de las lecturas de Unidades de Fluorescencia Relativa (RFU) para el ensayo MSF y de Densidad Óptica (DO) para el ensayo DELI.
- ✓ Comparar las IC50s de las drogas antimaláricas con baja, mediana y alta parasitemia con ambas pruebas.
- ✓ Determinar cuál de las pruebas DELI o MSF es más eficaz para el cálculo de la IC50

### **1.4 BASES TEÓRICAS**

#### **1.4.1 BASE TEÓRICA**



### 1.4.1.1 Enfermedad de la Malaria

La malaria o paludismo es la enfermedad parasitaria que causa más muertes en el hombre, siendo así que en el año 2013 se estimó que ocurrieron 198 millones casos de malaria y 584 000 muertes a nivel mundial. Malaria es una enfermedad causada por parásitos del genero *Plasmodium* que se transmite al ser humano por la picadura de mosquitos infectados (15).

Esta enfermedad, en humanos, es causada por varias especies del género *Plasmodium*, como *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* y *P. falciparum*. *P. falciparum* es un parásito eucariota unicelular que pertenece al reino Protozoo, filo Apicomplexa (16, 17). La transmisión de *Plasmodium* involucra dos hospederos, uno invertebrado (el mosquito) y un hospedero vertebrado (el hombre) (17, 18).

En áreas hiperendémicas el parásito es responsable de casi medio millón de muertes en niños menores de 5 años (15). Los síntomas se desarrollan entre los 6 a 8 días después de haber sido picado por un mosquito infectado. Las personas con malaria comúnmente presentan fiebre, escalofríos, dificultad respiratoria, dolor de las articulaciones, dolor de cabeza, diarrea acuosa o vómitos. Asimismo, la malaria severa suele acompañarse con varios procesos patogénicos como ictericia, insuficiencia renal, anemia severa siendo muchas veces fatales (19). La forma potencialmente más severa de la enfermedad, y la principal causa de muerte por malaria son provocados principalmente por la especie *P. falciparum* (20).

Desde 1941 se han reportado casos de malaria en el Perú, siendo el número de casos más altos en el año 1944 (95 000 casos) y el número de casos más bajo en el año 1965 (1 500 casos). La mayoría de casos estaban en la Costa Nor-Oeste de Perú, borde de Ecuador, y con escasos reportes en la región amazónica (borde de Colombia, Ecuador y Brasil). En 1988 no habían casos de *P. falciparum* en Loreto, pero en 1991 los casos aumentaron a 140 y así los casos fueron aumentando hasta finales de 1997 a 54 290 casos confirmados de *P. falciparum*; el porcentaje de incidencia de *P. falciparum* en Loreto aumentó desde el año 1992 al año 1997 de 1.6% a 44.8%. De esta manera, la prevalencia de especies en la región Iquitos se invirtió, siendo la especie *P. falciparum* casi igual de prevalente que *P. vivax*. En ese año (1997) Perú tenía una epidemia de malaria (*P. falciparum* y *P.*

*vivax*), siendo considerado el segundo país con mayores reportes de malaria en Sudamérica después de Brasil (21).

La Costa Norte es un segundo foco importante de casos de malaria, así como la región amazónica, no obstante, durante 1998 y 1999 (durante el fenómeno del Niño) el Perú sufrió una reemergencia acumulando el máximo número de casos en su historia, donde se reportaron más de 240 000 casos en el año 1998 (70% causados por *P. falciparum*). Los departamentos de Tumbes y Piura principalmente representaban las primeras áreas más prevalentes de esa región. Además, se concentró en esa región la mayor cantidad de casos de malaria por *P. falciparum* (67.2% de todo el país) (9). Desde esa fecha se ha ido disminuyendo la incidencia con picos máximos en el año 2002 (85 778 casos de malaria) y en el año 2005 (87 668 casos de malaria) (22).

La malaria por *P. falciparum* en el Perú es una enfermedad emergente con una distribución principal, desde el año 2012 hasta la actualidad, en Loreto (99.61 % de los casos nacionales), los otros casos se distribuyen en San Martín, Tumbes, Ucayali, Cusco y Madre de Dios (<1% de los casos nacionales). Durante los últimos 6 años, si bien Loreto concentra más del 99% de los casos por *P. falciparum*, las regiones de San Martín y Ucayali están incrementando el número de casos (con el 1% del total de los casos) (22). En el año 2013 en el Perú hubieron 6 630 casos confirmados de *P. falciparum*, de los cuales 4 fueron fatales (15, 23). En el año 2016 se reportaron 2 204 casos de *P. falciparum* de los cuales 1 falleció (22).

#### **1.4.1.2 Tratamiento de la Malaria**

La adecuada elección de la prescripción de la malaria por *P. falciparum* depende del lugar donde se adquirió la enfermedad, la edad del paciente, el patrón de susceptibilidad a drogas antimaláricas, el costo y la disponibilidad de las drogas. En los lugares donde hay resistencia a CQ, se usan otras drogas efectivas como la combinación SP, drogas bien toleradas durante el tratamiento. La investigación de nuevas drogas es una necesidad porque *P. falciparum* está adquiriendo más resistencia a los actuales medicamentos (24).

### ▪ Cloroquina

CQ o cloroquinafosfato, es una droga antimalárica 4-aminoquinolona, que fue descubierta en 1934. Esta droga fue la más usada para el tratamiento de malaria no complicada en los años 1940s-1950s (25). La CQ ha sido administrada para el tratamiento de *P. ovale*, *P. vivax* y *P. falciparum*. Sin embargo, *P. falciparum* y *P. vivax* ya han presentado resistencia a drogas por su uso excesivo. Esta droga es altamente efectiva durante el estadio eritrocítico asexual de *Plasmodium*, es decir actúa contra los esquizontes y trofozoitos de cualquier especie, y solo contra las formas gametocitas de *P. vivax* y *P. malariae* (26, 27).

CQ es efectiva en el estadio eritrocítico, ya que en este estadio el parásito degrada hemoglobina de manera activa y la droga interfiere en esta degradación. El parásito requiere degradar la hemoglobina de la célula como fuente de aminoácidos esenciales, durante el proceso, el parásito produce desechos solubles y tóxicos de hierro como Fe (II)-protoporfirina IX (FP), para evitar que estos productos tóxicos lo destruyan, el parásito secuestra el FP y lo polimeriza en moléculas insolubles llamadas “pigmento malárico” o hemozoina. (28, 29). Por otro lado, la CQ ingresa a la célula y a la vacuola digestiva por simple difusión, y ya dentro de la vacuola la CQ se oxida (CQ<sup>2+</sup>); y se adhiere a las moléculas de hemozoinas evitando que se continúen cristalizando, lo cual favorece la acumulación de hierro FP. Además, la CQ también se une a FP formando el complejo FP-CQ, siendo este complejo altamente tóxico, interrumpiendo la función de la membrana y finalmente se produce la lisis celular (10, 29).

### ▪ Quinina

Quinina de administración parenteral es usada principalmente para el tratamiento de las formas severas de malaria. La administración oral es usada en el tratamiento de malaria no complicada. Su acción es principalmente en el estadio asexual actuando en las formas de anillos y trofozoitos (esquizonticida) de *Plasmodium* y es gametocida para *P. vivax*, *P. malariae* y *P. ovale*, pero menos efectivo para gametocitos de *P. falciparum*. Su mecanismo de acción no es claro, pero por ser una base débil se concentra en la vacuola de *Plasmodium* al igual que la CQ y actúa igualmente inhibiendo la enzima hemo polimerasa y favoreciendo la acumulación de hierro tóxico. Esta droga presenta una

rápida absorción vía oral y endovenosa, pero es menos efectiva y más tóxica que CQ, por lo cual es solo usada en cepas resistente a CQ (27, 30).

#### ▪ Mefloquina

Es un antibiótico ampliamente utilizado por sus diferentes propiedades no solo antimaláricas. Entre sus propiedades antimalárica tiene un efecto esquizonticida actuando durante la etapa aguda de la enfermedad, pero su mecanismo de acción no es muy bien conocido. Sin embargo, se sabe que tiene un efecto contra los estadios asexuales de *P. falciparum* o *P. vivax* sensibles a MQ y resistentes o no a CQ, matando una gran cantidad de anillos y trofozoitos (31); y no afecta a estadios exoeritrocíticos del parásito (estadio hepático) en el caso de *P. vivax*. Se ha observado que después del tratamiento con MQ la vacuola alimenticia se hincha, por lo que se piensa que esta droga igualmente favorece la acumulación de productos tóxicos de la degradación de la hemoglobina, y que afectaría a la membrana de la vacuola alimenticia (28). No tiene significativo efecto en los estadios pre-eritrocitarios. Por lo tanto, no se suele usar esta droga como único tratamiento en pacientes con malaria por *P. vivax* sino en combinación con otras drogas exoeritrocitarias, para que elimine los estadios exoeritrocíticos de *P. vivax* (27, 32, 33).

#### 1.4.1.3 Resistencia de *P. falciparum* a drogas

La QN ha sido la primera droga antimalárica usada desde 1632 y la única hasta el siglo XIX. Posteriormente a 1914 se produjeron PQ y QNX, y en 1934 se produjo CQ, la cual en 1950 se convirtió en la principal droga para la erradicación de Malaria hasta 1960, cuando comenzaron a aparecer las primeras notificaciones de resistencia (34, 35).

Las primeras notificaciones de resistencia de *P. falciparum* en realidad fue hacia QN en los años 1844 y 1910, pero hay pocos estudios al respecto (34). La resistencia de *P. falciparum* a CQ ha sido extensamente estudiada. Basados en esos estudios se sabe que la primera resistencia a CQ se originó en dos focos independientes, en el continente asiático y en América. El primer foco fue en 1957 en el Sudeste de Asia, entre el borde de Tailandia y Camboya, el cual se extendió rápidamente hacia Tailandia hasta 1960. El otro foco de resistencia se confirmó en Sudamérica, en Venezuela y Colombia en 1960 (36). Después en 1976 se confirmaron otros casos de resistencia a CQ en Papúa Nueva Guinea.

Las cepas de este último foco y las cepas del Sudeste de Asia, a pesar de su proximidad, eran marcadamente distintas. En África, el primer caso de resistencia se dio en 1978 en Kenya y Tanzania; la resistencia se propagó en muchos países de África Central a mediados de 1980 y al Oeste a finales de 1980. Recientes estudios confirman que la propagación de los focos de resistencia en África se originaron en el continente Asiático, por sus diferencias con las cepas de Sudamérica y Papúa Nueva Guinea (34, 35).

En 1950, la CQ y PYR fueron utilizadas como tratamiento contra malaria por *P. falciparum* en América del Sur; diez años después comenzaron a aparecer los primeros casos de *P. falciparum* resistentes a CQ en áreas de Venezuela, Colombia y Brasil, donde previamente se había usado CQ como tratamiento profiláctico. Después continuaron apareciendo más casos de resistencia en lugares de la Amazonía, donde no se había utilizado la droga previamente, hasta que en los años 80s la resistencia se expandió por toda la región amazónica (37). Antes que la resistencia a CQ se expandiera, en 1970, ya se había introducido como tratamiento la terapia combinada de antifolatos SP para hacer frente a la resistencia a CQ. Sin embargo, a pesar que ya se había demostrada resistencia a antifolatos *in vitro*, en Brasil en 1965 y en Venezuela en 1970, el complejo SP se continuó usando por su efectividad en infecciones resistentes a CQ hasta 1980. Poco tiempo después a ese año se identificaron resistencias *in vivo* tanto en Colombia como en Brasil (37, 38). Por otro lado, en los demás países de América del Sur, incluyendo la región amazónica del Perú, tras la aparición de resistencia a CQ, no es hasta 1995 cuando recién se reemplazó CQ por el complejo SP. La resistencia a PYR se propagó en estos países, y a fines de la década 90 el complejo SP ya no era efectiva frente a cepas resistentes a CQ (37, 39).

Después de la expansión de la resistencia a SP, en el 2011 la OMS recomendó la terapia combinada con ART (ACT, según sus siglas en inglés) como tratamiento para malaria no complicada por *P. falciparum* (1, 40). La OMS basada en la evidencia de eficacia recomienda las siguientes combinaciones para el tratamiento de malaria por *P. falciparum*: AL, AS+AQ, AS-MQ, DHA-PIP, AS-SP, la elección de cual combinación se usaría con el derivado de ART sería de acuerdo al nivel de resistencia de la región de la droga acompañante (31). Al combinar algún derivado de ART (droga de corta vida media, 1 hora) con otra droga como MQ (droga de mayor vida media, mayor de 1 día) en

un tratamiento de 3 días, el derivado de AS por su acción potente contra la forma sexual (con una tasa de reducción de 10 000 veces en cada ciclo sexual), además, por su acción gametocida en estadios jóvenes de gametocitos (estadio 1-3), disminuye la morbilidad y reduce la incidencia de malaria pero no bloquea la transmisión definitivamente (11, 41-43). La droga acompañante elimina los parásitos sexuales residuales (quedando solo < 0.0001%), y por su mayor vida media en la circulación provee de protección contra la posible resistencia a la misma. Al combinar estas drogas la probabilidad de desarrollo de resistencia por parásito se reduce significativamente de 1 en  $10^{12}$  a 1 en  $10^{24}$  parásitos, lo cual es favorable en áreas de baja transmisión de la enfermedad, donde las posibilidades de transmisión de resistencia es mayor (25, 41, 44). Desde 2010, la Norma Nacional de drogas de Malaria formuló el uso del tratamiento ACT como una política normativa, y se incluye en el nuevo esquema de tratamiento contra *P. falciparum* en lugares donde hay evidencia de resistencia a CQ, MQ y SP (45). Desde entonces el tratamiento ACT se ha convertido en el tratamiento más usado y eficaz, por presentar buena adherencia al tratamiento, pocos efectos adversos y el efecto profiláctico que provee la ART (46). Este efecto profiláctico, que no es más que el efecto residual de la droga acompañante del derivado de AS por días a semanas, después de terminar el tratamiento podría producir un efecto adverso, actuando como un filtro de parásitos resistentes que se adquieren de reinfecciones, promoviendo así la propagación de la resistencia de la droga acompañante (LUM, AQ, MQ, PIP o SP). Por lo tanto, el efecto residual de la droga acompañante al inicio del tratamiento es efectivo, pero después no protege ante una posible aparición de resistencia (41, 47). Las combinaciones actualmente usadas son AS-MQ, el cual es usado principalmente en el Sudeste de Asia y Sudamérica; AS-SP es adoptado en Sudáfrica, Oriente medio y sur de Asia, donde la susceptibilidad a SP es alta. Las demás combinaciones como AS-MQ o AL, DHA-PIP todavía no se aplican y se encuentran en estudios de eficacia y efectos adversos (41).

En el año 2012, la OMS recomendó la adición de una dosis de PQ al tratamiento ACT por su efectiva acción gametocida, así se bloqueó la transmisión de gametocitos de *P. falciparum*, lo cual fue primordial para el programa de eliminación de la malaria, por lo tanto, se intentó disminuir la transmisión de resistencia de ART por *P. falciparum*. La limitación de esta nueva medida fue que en individuos con deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (G6PD) (5% - 32.5% en áreas endémicas de malaria; África y

Asia) produce anemia hemolítica, por lo que previamente a la administración de la droga se tendría que medir la deficiencia de esta enzima en los pacientes, lo cual en la práctica es inviable y por lo tanto esto limitaba su aplicación (48). Luego de estudios de eficacia y protección, la OMS implementó esta recomendación reduciendo la dosis de PQ, y normó dar una dosis de PQ de 0.25 mg base/Kg a todos los pacientes con parasitología confirmada de *P. falciparum*, adicionalmente al tratamiento ACT (excepto en gestantes y menores de 6 meses) e indicó que esta concentración no produce toxicidad en individuos con deficiencia de G6PD, y seguiría siendo igualmente efectiva para bloquear la transmisión de gametocitos de *P. falciparum*; de esta forma no sería necesaria la medición de alguna deficiencia enzimática previamente a la administración de PQ (31, 49).

Por otro lado, en el Sudeste de Asia, al Sur de Laos y Nor-Oriental de Combodia, se reportaron casos de resistencia a derivados de ART. Actualmente se está estudiando nuevas drogas para reemplazar a ART, pero el panorama no es alentador por lo que se deben tomar nuevas medidas en el Sudeste de Asia para evitar que la resistencia a ART o a las drogas acompañantes se propaguen a la India y África (50).

Desde 1954 hasta el año 1980 la estrategia de tratamiento de malaria por *P. falciparum* era en base de monoterapia con CQ y dosis de PQ para eliminar los gametocitos y prevenir la transmisión. Durante 1980 y 1992 se puso más énfasis en los programas de control de la malaria frente a la resistencia a CQ y SP. Desde entonces, el Perú ha pasado por tres etapas que se denominaron monoterapia, terapia múltiple y terapia de combinación. En 1990-1994 el tratamiento se basaba en monoterapia con CQ junto con otros esquemas en base a SP para infecciones que no respondían a CQ, o quinina para las formas graves de malaria (9).

Entre 1994 a 1999, por los constantes fallos de tratamientos se cambió a la terapia múltiple para malaria por *P. falciparum* en todo el país, ampliándose a tres esquemas de tratamientos, los cuales serían: como primera opción terapéutica CQ-PQ, segunda opción terapéutica SP+PQ, y QN+TET+PQ como tercera opción terapéutica (51).

En 1997 el Ministerio de Salud (MINSA) reconoce que la CQ había perdido su eficacia en la Amazonia, y efectuó el cambio de la primera línea terapéutica para el tratamiento de

*P. falciparum* de CQ a SP en las provincias de Maynas, Loreto y Ramón Castilla, mientras que en Ucayali y alto Amazonas se continuó utilizando CQ por presentar menos de 20% de falla terapéutica. Así se continuó hasta 1998, cuando también se cambió la CQ por SP. Durante esos años (1998-2000) en la región amazónica la falla terapéutica a SP estaba entre 5% y 20%. Además, en la Costa Norte las cepas, igualmente, tenían resistencia a CQ, pero la combinación SP seguía siendo efectiva (51, 52). Sin embargo, en estudios realizados por el Ministerio de Salud se encuentra resistencia de *P. falciparum* de 30% en la Costa Norte y en la región amazónica también una resistencia similar (53).

Para asegurar un tratamiento eficaz se tenía que reemplazar definitivamente la CQ en todo el país, y para retardar la resistencia a SP en la región amazónica se debía hacer un cambio de esquema de tratamiento de acuerdo a la resistencia presentada en cada región. Así en 1999 se propuso el cambio de la terapia múltiple a la terapia de combinación en todo el país (54). Las combinaciones variaban según la falla de tratamiento que se observaba en los estudios de vigilancia de la eficacia de medicamentos antimaláricos, así en la amazonia la MQ y AS serían la primera opción de tratamiento, y la segunda opción QN+CL. Sin embargo, en la Costa Norte como primera opción de tratamiento se usarían a SP-AS, como segunda opción de tratamiento la MQ-AS, y la tercera opción de tratamiento QN-CL. En el año 2001 se implementa la nueva política de medicamentos antimaláricos basado en drogas de combinación, la cual sigue vigente hasta la actualidad (9, 52, 55).

En la Norma Técnica actual para el tratamiento de la malaria no complicada por *P. falciparum* el Ministerio de la Salud, CQ ya no está incluida en los esquemas terapéuticos en el tratamiento de la malaria en el Perú, ni en la Costa Norte ni en la región Amazónica por la amplia presencia de resistencia a esta droga (10).

En la actualidad en la Costa Norte del Perú; en los departamentos de Tumbes, Piura, Lambayeque, La Libertad y Ancash, la primera opción de tratamiento consiste en SP y AS, y como tratamiento de segunda opción MQ-AS y tercera línea de tratamiento QN+CL+PQ. En áreas de la Costa Norte donde *P. falciparum* es resistente a SP, el tratamiento se administra como primera opción a AS y MQ, y como segunda opción de tratamiento se medica QN, CL y PQ (10, 56).



También, en la Amazonia Peruana, área donde la resistencia a CQ y SP está ampliamente difundida, se administra como primera opción de tratamiento MQ+AS, y como terapia electiva (segunda opción), y solo cuando no se observa respuesta a la primera opción se administran QN+CL+PQ. En la actualidad, la terapia combinada a ART y sus derivados cumplen una función esencial en el tratamiento de *P. falciparum* con fármaco resistencia a múltiples drogas, así como para malaria grave y complicada causada por *P. falciparum* multirresistente (10).

En conclusión, en el Perú el tratamiento con MQ para malaria no complicada por *P. falciparum* está indicado en la Costa Norte como segunda opción de tratamiento y en áreas donde se ha notificado resistencia a SP, y como primera opción de tratamiento en la región amazónica, donde se ha identificado resistencia a CQ y a la terapia combinada SP.

#### **1.4.1.4 Pruebas de sensibilidad a drogas antimaláricas *in vitro***

Los métodos *in vitro* MSF y DELI son herramientas de laboratorio que proveen información complementaria en la epidemiología de drogas antimaláricas, pero que no pueden reemplazar los estudios clínicos. Actualmente se conocen varias pruebas de sensibilidad *in vitro* y la OMS las agrupa de la siguiente forma:

- a) Métodos de visión directa de parásitos en el microscopio
- b) Métodos de incorporación de precursores radioisótopos dentro del parásito
- c) Métodos no radioactivos

Se explicará dos de los métodos no radioactivos MSF y DELI:

- **Prueba fluorescencia para Malaria basado en el reactivo SYBR Green-I (MSF)**

El fundamento de este método es que se utiliza el reactivo SYBR Green I el cual está compuesto por una solución de fluorocromo, denominado benzothiocarboxypurina (BCP), que presenta afinidad intercalante a los pares de bases GC presentes en el ácido desoxirribonucleico (ADN) (57). *P. falciparum* es una especie con un GC extremadamente bajo (GC ~20%) (58). Este colorante se une eficientemente al ácido desoxirribonucleico de cadena doble (dsADN) y al ácido desoxirribonucleico de cadena

simple (ssADN), pero en este último presenta una fluorescencia bastante baja (59). Asimismo, el colorante es permeable a los glóbulos rojos por lo que el ADN de *P. falciparum* puede ser teñido dentro de los glóbulos rojos (57, 60). Además, el reactivo también tiene un buffer de lisis (Triton X-100) para garantizar que todas las células se lisen y que todo el ADN parasitario se tiña; de esta manera el reactivo lisa las células (glóbulos blancos y rojos) y luego el fluorocromo colorea todo el ADN presente en la muestra, tanto el ADN parasitario así como también el ADN de los glóbulos blancos (61).

Esta solución de fluorocromo se adiciona directamente a la muestra donde se desea cuantificar el ADN presente y con el reactivo lisante (presente en el reactivo) se lisa las células, el fluorocromo se une a los pares de bases G-C presentes en el ADN, el cual se detecta por fluorescencia (62). Una muestra es excitada por la luz producida por una fuente de luz y filtrada a una longitud de onda por un filtro. La muestra excitada emite luz, usualmente a una energía más baja y una longitud de onda más larga que la luz de excitación, y fluoresce dentro de microsegundos después de la excitación (61). La luz emitida se filtra, recolecta y mide con un detector, y se cuantifica en Unidades Relativas de Fluorescencia (RFU). Para que las medidas de fluorescencia reflejen directamente la cantidad de ADN procedentes de la multiplicación celular del parásito y no una contaminación con ADN leucocitarios, previamente se debe remover los leucocitos de la muestra mediante métodos de filtración leucocitaria. Este último aspecto se considera una limitante del método, ya que la filtración no siempre es efectiva (63). La emisión de fluorescencia se mide a una longitud de onda a 535 nm. La segunda limitante del método es que no mide rangos de parasitemias menores a 0.1% (61, 62). El método es seguro, simple, no requiere una instrumentación costosa y el cálculo de la IC50 como reflejo de la inhibición del crecimiento puede ser calculado en solo 15 minutos (62, 63).

- **Prueba inmuno - enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (DELI)**

Esta prueba se fundamenta en un ensayo inmuno - enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) de *Plasmodium*. Los anticuerpos primarios son muy específicos para especies de *Plasmodium*, capaces de detectar parasitemias tan bajas como 0.005% de *P. falciparum* (6).

Después de 48 horas de incubación de la muestra con la droga antimalárica se congela la mezcla y se descongela tres veces, para asegurar la completa hemólisis y liberación de la LDH. Esta suspensión se adiciona a la placa de Elisa, que ya tiene previamente los anticuerpos monoclonales primarios específicos para LDH de *P. falciparum*. El segundo paso es adicionar los anticuerpos monoclonales biotinilados específicos para LDH de *P. falciparum*, luego se agrega el conjugado estreptavidina-peroxidasa, y finalmente, el sustrato-cromógeno (peróxido más tetrametilbenzidina) hace posible la aparición de un producto coloreado, el cual se mide por espectrofotometría a 450 nm (5, 6).

La detección de LDH representa la actividad metabólica de los parásitos vivos. La cuantificación del LDH malarial corresponde a la actividad de parásitos sobrevivientes con una actividad glucolítica normal (28).

#### **1.4.1.5 Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de drogas antimaláricas**

El valor de la IC50 indica la concentración de la droga que es necesario para inhibir la producción del indicador o metabolito de una función biológica a la mitad (64).

La IC50 de una droga antimalárica es la concentración de un fármaco antipalúdico que inhibe el 50% del metabolismo del parásito, sea LDH, ADN o proteína HRP-2, en comparación con los correspondientes valores en pozos de controles libres de drogas (65).

En el ensayo DELI el nivel de enzima LDHp liberado por el crecimiento del parásito es determinado por medidas de densidades ópticas (66). La IC50 en el ensayo DELI es la concentración de la droga (nM) que inhibe la producción de la enzima LDH en un 50%. Por otro lado, en el ensayo MSF la concentración de ADN es medida con la emisión de fluorescencia expresada como unidad de fluorescencia relativa (RFU), y la IC50 en este ensayo es la concentración de la droga (nM) que inhibe en un 50% la replicación del parásito (67).

#### **1.4.1.6 Eficacia de los ensayos de sensibilidad no radiactivos**

La eficacia de los ensayos de sensibilidad es la capacidad de alcanzar los resultados que se esperan o se desean tras la realización del ensayo, es decir lograr tener un resultado de sensibilidad *in vitro* satisfactorio.

No hay estudios de eficacia de los ensayos de sensibilidad no radiactivos, y en este estudio se establecieron como indicadores de eficacia al éxito del cálculo de la IC50, Coeficiente de determinación de Curvas (R2) y CV de lecturas de RFU y DO. Considerando que en diferentes estudios cuando se comparan las lecturas de IC50, hacen referencia a que los valores de R2, como un parámetro de medida, e indican que cuando los R2 son cercanos a 1 los valores de las IC50 son más interpretables y precisas (68-70). Asimismo, el porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 también fue utilizado como indicador de eficacia en otro estudio (71). Por otro lado, en los ensayos de laboratorio que brindan valores continuos, el CV es un indicador estadístico de la precisión ya usado por algunos autores en ensayos de ELISA (72, 73)

Se definirá que una prueba es eficaz para el cálculo de IC50, cuando la prueba presente resultados superiores estadísticamente en los tres indicadores de eficacia del presente estudio.

#### **1.4.1.7 Indicadores de eficacia en el cálculo de IC50**

Se establecieron 3 indicadores de eficacia, los cuales fueron parámetros para determinar si una prueba es eficaz o no.

- **Éxito del cálculo de la concentración inhibitoria media máxima (IC50)**

En este estudio el éxito del cálculo de la IC50 indica que si fue posible determinar la IC50 de una droga de forma exitosa. Se consideró que el cálculo de la IC50 es un factor determinante para considerar si un parásito es sensible o no a una droga, porque sin un resultado preciso de IC50 no es posible saber si una cepa es sensible a una determinada droga *in vitro*. Por lo tanto, es uno de los tres factores más importantes para determinar la eficacia de los ensayos DELI o MSF. Por otro lado, si no es posible su cálculo puede deberse a motivos como fallo en el desarrollo del ensayo o a la falta de sensibilidad de la prueba.

- **Coeficiente de determinación de Curvas (R2)**

Con los ensayos DELI o MSF se puede calcular la IC50 de las drogas antimaláricas. Para calcular la IC50 se utiliza una fórmula matemática, que sigue un modelo de curva de

respuesta-inhibidor, de donde se calcula el valor de la IC50, el R2 es un parámetro que indica que la curva se ajusta al modelo matemático, es decir, el R2 nos indica si todos o la mayoría de puntos están dentro de la curva (64, 69).

El R2 es la suma de los cuadrados de las distancias de los puntos de la mejor curva de respuesta-inhibidor, el cual se determina por un modelo (ecuación) de regresión no lineal mediante el programa GraphPad 4. El R2 por su naturaleza no presenta unidades y su valor es una fracción entre 0.0 y 1.0, y los valores más altos indican que los datos se ajustan mejor al modelo. Cuando R2 es igual a 0.0, la curva que mejor forman los datos no se ajusta al modelo y tiende a una línea horizontal. En este caso, saber  $x$  no ayuda a predecir  $y$  (74).

Cuando  $R^2 = 1$  o cercanos a 1, se interpreta como todos los puntos se encuentran exactamente en la curva sin dispersión o con mínima dispersión. En este caso, si se conoce  $x$  se puede calcular  $y$  directamente (75).

Un error es utilizar R2 como criterio principal para determinar si un ajuste es razonable. Un R2 alto indica que la curva de donde se calculó la IC50 estuvo muy cerca de los puntos de los datos. El ajuste puede ser ambiguo y se debe considerar otros datos para evaluar la precisión de una curva, y no solo el R2 (75).

- **Coefficiente de Variación (CV) de lecturas**

El Coeficiente de variación (CV) es un estadístico de dispersión relativa de un grupo de datos, se obtiene dividiendo la desviación estándar del grupo entre su media aritmética y para una muestra se expresa como (a), y en el estudio la muestra son el conjunto de valores de RFU o DO de las diluciones sucesivas de cada droga.

(a) 
$$CV = \frac{s}{\bar{X}} (100)$$

Donde:

CV: coeficiente de variación

s: Desviación estándar de los valores de RFU o DO de las diluciones sucesivas de cada droga

$\bar{x}$ : Media aritmética de los valores de RFU o DO de las diluciones sucesivas de cada droga

Los coeficientes de variación tienen las siguientes características (72, 76):

- Puesto que tanto la desviación estándar como la media se miden en las unidades originales, el CV resulta una medida independiente de unidades.
- En áreas de investigación donde se tienen datos de experimentos previos, el CV es muy usado para evaluar la precisión de ensayos, comparando el CV de un ensayo dado con los valores del mismo en ensayos pasados.
- El CV es el estadístico más adecuado por encima de la desviación estándar (SD) como una medida de precisión de los datos.

En el ensayo MSF se representaron los coeficientes de variación de las medidas de RFU como datos **positivos** cuando todos los datos de CV fueron  $< 10\%$  y como datos **negativos** cuando se calculó al menos dos a más valores de CV  $> 10\%$ . Se representaron los coeficientes de variación de las medidas de DO del ensayo DELI como datos **positivos** cuando todos los datos de CV fueron  $< 20\%$  y como datos **negativos** cuando se calculó al menos dos a más valores de CV  $> 20\%$  (73).

## 1.4.2 DEFINICIÓN DE TÉRMINOS

**Caso de malaria:** Ocurrencia de una infección de malaria en una persona en quien la presencia del parásito de la malaria en la sangre ha sido confirmada por una prueba de diagnóstico.

**Caso confirmado:** Un caso de malaria (o infección) en el cual el parásito ha sido detectado en una prueba de diagnóstico, por ej. microscopía, prueba rápida o por pruebas de biología molecular.

**Droga gametocida:** Droga que mata gametocitos hembras o machos, por lo tanto, previene que algún mosquito se infecte.

**Droga esquizonticida:** Droga que mata esquizontes sanguíneos o hepáticos.

**Densidad parasitaria:** Número de parásitos asexuales por unidad de volumen de sangre o por número de glóbulos rojos.

**Esquizonte eritrocitario (etapa asexual):** Es una forma de desarrollo del parásito de la malaria en la sangre, en la que se forman merozoitos (la etapa que invaden los eritrocitos).

**Esquizogonia:** Es la etapa reproductiva asexual del parásito de la malaria en los eritrocitos y en las células hepáticas, en esta etapa múltiples divisiones nucleares son seguidos por la formación de una célula hija (merozoitos) alrededor de cada núcleo.

**Gametocito:** Estadio reproductivo sexual del parásito de la malaria. Pueden potencialmente infectar mosquitos anofeles cuando ingieren sangre.

**Malaria no complicada por *P. falciparum*:** Parasitemia sintomática de malaria sin signos de severidad o evidencia de algún órgano disfuncional.

**Monoterapia:** Tratamiento antimalaria con un simple componente activo o una combinación sinérgica de dos componentes con mecanismos de acción relacionados.

**Parasitemia:** Presencia de parásitos en la sangre.

**Reinfección:** Es una nueva infección después de la primera infección, se diferencia de recrudescencia porque el genotipo del parásito es diferente al de la primera infección.

**Resistencia a drogas:** La habilidad de una cepa a sobrevivir y/o multiplicarse a pesar de la absorción de una medicina dada en dosis igual o mayor a la dosis recomendada.

**Sensibilidad / Susceptibilidad a una Droga:** Un organismo es sensible /susceptible a una droga cuando la infección causada por este responde al tratamiento con esta droga, a una dosis recomendada.

**Terapia combinada:** Es la combinación de dos o más clases de drogas Antimaláricas con diferentes mecanismos de acción.

**Tratamiento ACT/Terapia basada en combinación de artemisina:** Es la combinación de un derivado de artemisina con una droga antimalárica de larga duración que tiene un diferente modo de acción.

### **1.4.3 FORMULACIÓN DE LA HIPÓTESIS**

Las eficacias de las pruebas DELI y MSF para calcular la IC50 de drogas anti-*Plasmodium falciparum* en drogas Cloroquina, Mefloquina y Quinina son iguales.



## **CAPITULO II**

### **MÉTODOS**

## **2.1 DISEÑO METODOLÓGICO**

### **2.1.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN**

El estudio fue descriptivo, ya que solo se describe los parámetros en la población de estudio a partir de una muestra, y cuantitativo porque las variables otorgan datos cuantitativos.

### **2.1.2 DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN**

El estudio fue observacional, porque no existe intervención del investigador y los datos reflejan la evolución natural de los ensayos, y prospectivo ya que los datos necesarios para el estudio fueron recogidos a propósito de la investigación. Asimismo, el estudio fue transversal porque todas las variables fueron medidas en una sola ocasión en grupos paralelos.

### **2.1.3 POBLACIÓN**

La población de estudio fueron los aislamientos de *Plasmodium sp.* de los casos de malaria detectados en los pobladores de las comunidades de la jurisdicción del Puesto de Salud Padre Cocha del distrito de Punchana, provincia de Maynas, región Loreto, ubicada a 3°41'37.8"S 73°16'17.8"W. (Ver imagen N°1 y N°2)

Fueron 7 comunidades las que acudían al Puesto de Salud Padre Cocha: Nuevas Vida, San Andrés, Momoncillo, Porvenir, Progreso, Fray Martín y Primavera. (Ver imagen N°3)

### **2.1.4 MUESTRA Y MUESTREO**

La muestra fueron los aislamientos de *P. falciparum* de los casos de malaria sintomática detectados en el puesto de Salud Padre Cocha, de la comunidad Padre Cocha del distrito de Punchana, provincia de Maynas, región Loreto.

El muestreo fue por conveniencia, incluyendo a todos los pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión en el periodo febrero - noviembre del 2015, hasta completar el tamaño muestral.

Para calcular el tamaño de muestra se realizó el cálculo con 5 muestras que contaban con resultados de las pruebas DELI y MSF, y se utilizó la fórmula para el cálculo del tamaño de muestra de la comparación de dos medias repetidas (pareadas) en un solo grupo (77):

$$n = \frac{2(Z_{\alpha} + Z_{\beta})^2 * S^2}{d^2}$$

Dónde:

- $n$  = sujetos necesarios en cada una de las pruebas
- $Z_{0,05}$  = Valor Z correspondiente al riesgo deseado; 1,96
- $Z_{95\%}$  = Valor Z correspondiente al riesgo deseado; 1,645
- $S^2$  = Varianza de la variable cuantitativa que tiene un grupo QN-deli de referencia: 235.99
- $d$  = Valor mínimo de la diferencia que se desea detectar (datos cuantitativos): 20.27

Remplazando

$$n = \frac{2(1,96+1.645)^2 235.99}{20,27^2} = 14.93$$

Se seleccionaron 16 casos de aislamientos de *P. falciparum* de personas con malaria para un riesgo de 0.05% y una potencia del 95%.

#### 2.1.4.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ✓ Pacientes con monoinfección por *P. falciparum* y una densidad parasitaria mayor a 245 parásitos/ $\mu$ L.

- ✓ No haber ingerido drogas antimaláricas como cloroquina, quinina, mefloquina, artesunato, sulfadoxina/pirimetamina, clindamicina, primaquina o antibióticos con efecto antimalárico durante la actual enfermedad.
- ✓ Haber firmado el consentimiento informado del protocolo del proyecto de “Distribución de Malaria”.

#### **2.1.4.2 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN**

- ✓ Pacientes con resultado positivo a otro hemoparásito distinto a *P. falciparum* o sospecha de bacteriemia.
- ✓ Paciente positivo a *P. falciparum* y con densidad parasitaria desconocida.

#### **2.1.5 VARIABLES**

- **Variable a comparar:** Eficacia de las pruebas DELI y MSF para calcular la IC50

Variable	Definición operacional	Indicadores	Definición conceptual	Tipo de Indicador	Valor del Indicador
Eficacia de las pruebas DELI y MSF para calcular la IC50	Prueba MSF	Éxito del cálculo de IC50	Porcentaje de éxito del cálculo de las IC50s obtenidas de las lecturas de RFU	Cualitativo	SI: CON ÉXITO NO: SIN ÉXITO
		Análisis de curvas	Coeficiente de determinación de curvas (R2)	Cuantitativo	R2 $\approx$ 1 R2 $\approx$ 0
		Resultados de las lecturas de RFU	Coeficiente de variación (CV) de las lecturas de RFU a 1 hora y a las 24 horas.	Cualitativo	POSITIVO: CV <10% NEGATIVO: CV >10%
	Prueba DELI	Éxito del cálculo de IC50	Porcentaje de éxito del cálculo de las IC50s obtenidas de las lecturas de absorbancias	Cualitativo	SI: CON ÉXITO NO: SIN ÉXITO
		Análisis de curvas	Coeficiente de determinación de curvas (R2)	Cuantitativo	R2 $\approx$ 1 R2 $\approx$ 0
		Resultados de las Densidad Óptica (DO)	Coeficiente de variación (CV) de las lecturas de DO a los 20 minutos	Cualitativo	POSITIVO: CV <20% NEGATIVO: CV >20%

En base a los resultados que se obtuvieron de los tres indicadores de eficacia se definió como una prueba eficaz para el cálculo de IC50, a la prueba que presentó resultados superiores estadísticamente frente al otro ensayo en al menos dos de los tres indicadores que se establecieron en este estudio.

## **2.1.6 TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÓN DE DATOS**

Las técnicas que se utilizaron en el presente estudio fueron las pruebas MSF y DELI. Se utilizó como instrumento una ficha de recolección de datos debidamente elaborada y ordenada, donde se registraron todos los datos que se recopilaron durante la investigación, los cuales fueron organizados en una base de datos para su análisis. (ANEXO N°1)

## **2.1.7 PROCEDIMIENTOS Y ANÁLISIS DE DATOS**

En la comunidad Padre Cocha en Iquitos, a las personas que acudieron al puesto de salud Padre Cocha con síntomas presuntivos de malaria durante el periodo febrero-diciembre del año 2015, se les realizó tamizaje mediante gota gruesa en el marco del proyecto “Distribución de la Malaria en el Perú” con número de protocolo NAMRU6.2007.0004 de NAMRU-6, el cual contaba con previa autorización del comité de ética de NAMRU-6.

A las personas que tuvieron un resultado positivo a *Plasmodium sp.* en el tamizaje mediante gota gruesa según la Norma Técnica para la atención curativa de la Malaria del MINSA (10) (ANEXO N°2), se les invitó a participar en el proyecto “Distribución de Malaria en el Perú”. Las personas que aceptaron participar en el estudio firmaron el consentimiento informado escrito para participar en el estudio titulado “Distribución de la Malaria en el Perú” NAMRU6.2007.0004 (ANEXO N°3). Se les tomó una muestra de 3 mL de sangre en un tubo con EDTA, luego se transportó la muestra y la lámina con la gota gruesa que fue analizada anteriormente al laboratorio de Parasitología de NAMRU-6 Iquitos.

En el laboratorio se revisó cada lámina de gota gruesa por segunda vez para corroborar el diagnóstico de especie, y a partir de la muestra de 3mL se realizó un frotis delgado para confirmar la identificación de la especie de *P. falciparum* de cada muestra, adicionalmente se realizó otra gota gruesa para verificar el estadio de anillo de las muestras antes de la

incubación. Después se calculó la densidad parasitaria (**ANEXO N°4**), y el volumen de medio de cultivo necesario para ajustar el hematocrito a 6% (**ANEXO N°5**). Luego se distribuyó la suspensión de hematíes de cada muestra al 6% en dos placas de cultivo celular con drogas CQ en las filas A y B, QN en las filas C, D, E y MQ en las filas F, G y H. Las concentraciones iniciales de CQ, QN y MQ fueron 2000nM, 2003.4nM y 150nM respectivamente, a partir de las cuales se realizaron 10 diluciones seriadas a la mitad hasta llegar a las concentraciones finales de 1.95nM, 1.95nM y 0.14nM respectivamente (**ANEXO N° 6**). Luego se incubaron ambas placas a 37°C por 48 horas. (**ANEXO N° 7**)

Después de la incubación se congelaron las dos placas a -80°C y se trasladaron en recipientes con hielo seco al laboratorio de NAMRU-6 en Lima. En el laboratorio de NAMRU-6-Lima se descongelaron las dos placas de cada muestra y se realizaron los ensayos DELI (**ANEXO N°8**) y MSF (**ANEXO N°9**). Finalmente se calcularon las IC50s de cada ensayo con el programa GraphPad 4.

Mediante el programa GraphPad 4 se calcularon las IC50 de las drogas CQ, QN y MQ de los dos ensayos; asimismo, los datos de R2 se obtuvieron de los resultados que brinda el programa GraphPad 4. El cálculo de la IC50 indica que sí fue posible calcular la IC50 de una droga, considerándose como éxito cuando se pudo calcular la IC50 en las tres drogas CQ, QN y MQ de cada ensayo, y sin éxito cuando no se pudo calcular la IC50 de al menos una droga sea CQ, QN o MQ en cada ensayo.

Finalmente, el CV de cada droga se calculó con el programa SPSS a partir de las lecturas de DO y RFU de cada ensayo. Los datos se registraron en el programa Excel 2010 según la Ficha de recolección de datos (**ANEXO N°1**).

Se analizó la distribución de los datos mediante gráficas para determinar si la distribución de los datos seguía una distribución normal, y se realizó el test de Shapiro-Wilk para evaluar normalidad de los datos.

Mediante el programa Excel 2010 se realizaron gráficos de barras para representar los resultados de frecuencia en porcentaje, y gráficos de barras agrupadas por categoría. El

análisis de cada variable se realizó con estadísticos diferentes por la naturaleza de las mismas.

Para determinar si existen diferencias estadísticamente significativas entre las variables se utilizó la prueba de Wilcoxon y la prueba de McNemar-Bowker para muestras pareadas con  $p < 0.05$ . Todos los análisis de datos se realizaron en el programa estadístico SPSS versión 24.

### **2.1.8 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

- El estudio fue realizado bajo la autorización del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) como parte del protocolo titulado: “Distribución de la Malaria en el Perú” NAMRU6.2007.004, estudio observacional, el cual cuenta con aprobación del Comité de Ética de NAMRU-6. (**ANEXO N°10**)
- Se mantuvo la confidencialidad de los datos de los pacientes, para ello se les asignó un código alfa- numérico cuya correspondencia con el número de la historia clínica fue de conocimiento solamente de uno de los investigadores.
- Los pacientes firmaron un consentimiento informado escrito y consentimiento para el uso futuro de las muestras biológicas del protocolo de “Distribución de la Malaria en el Perú”, que cuenta con la aprobación del comité de Ética del Centro de investigación de enfermedades tropicales de la marina de los EE.UU. (NAMRU-6) (**ANEXO N°3**)



## **CAPITULO III**

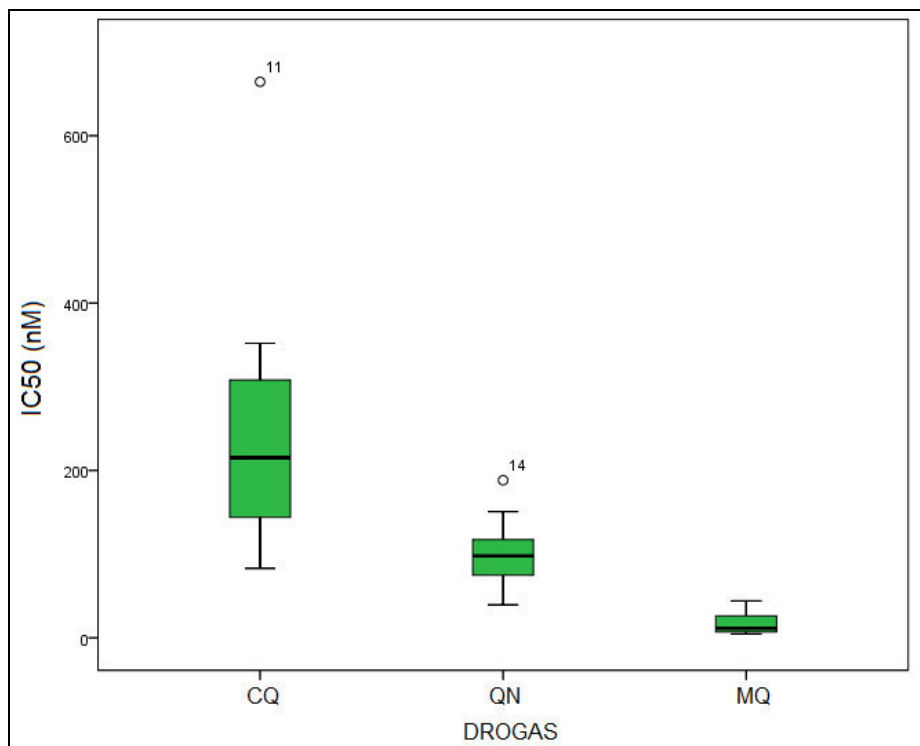
## **RESULTADOS**

### 3.1 LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA MÁXIMA (IC<sub>50</sub>) DE LAS DROGAS MEFLOQUINA, QUININA Y CLOROQUINA MEDIANTE LAS PRUEBAS DELI Y MSF.

Se recolectaron 18 muestras de sangre, de las cuales 2 se rechazaron por presentar contaminación en el cultivo y no poder realizarse la prueba DELI. En total se procesaron 16 muestras. **ANEXO N°11 y N°12**

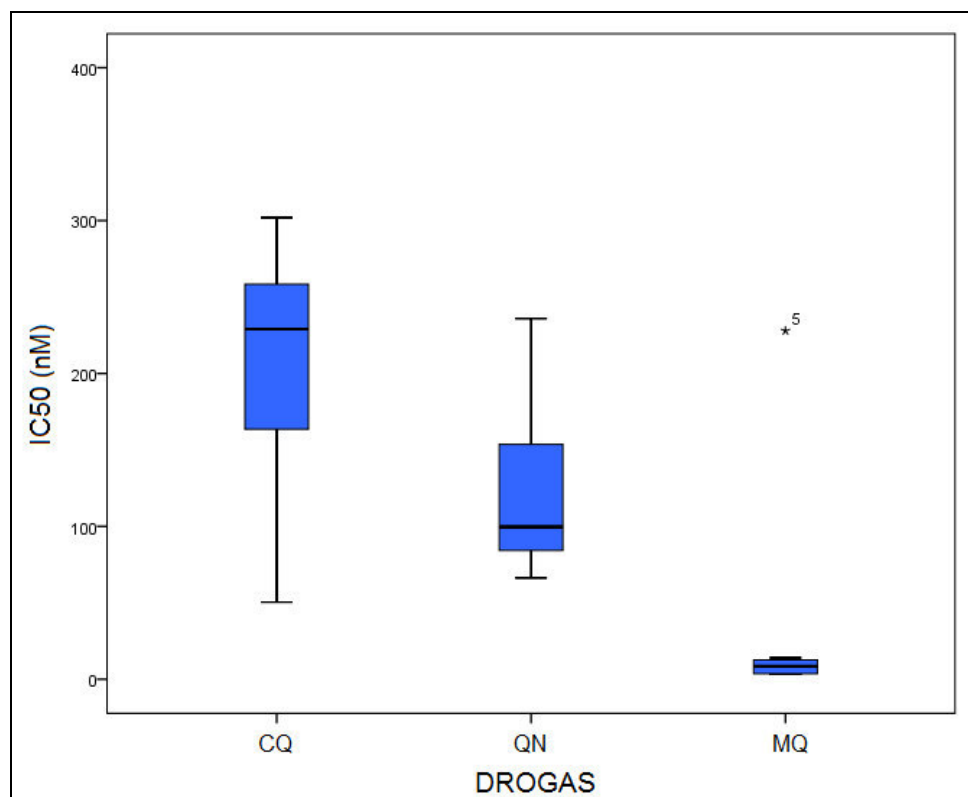
Las medias aritméticas de los valores de IC<sub>50</sub> con el ensayo DELI fueron para CQ 231.26 nM, QN 101.17 nM y MQ 16.03 nM (**Gráfico N°1**). Las medias de los valores de IC<sub>50</sub> con el ensayo MSF fueron para CQ 227.52 nM, QN 142.46 nM y MQ 35.07 nM. (**Gráfico N°2**). En el diagrama de cajas del gráfico N°1 los puntos fuera de las cajas indican los valores extremos en CQ (664.40nM) y QN (188.25nM) y en el gráfico N°2 el punto fuera de caja de MQ indica el valor del IC<sub>50</sub> de 227.9nM.

**Gráfico N°1. Concentración inhibitoria media máxima (IC<sub>50</sub>) de drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con el ensayo de sensibilidad *in vitro* DELI: Ensayo de inmuno detección Doble –Enzima Lactato Deshidrogenasa.**



**Gráfico N°2. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con el ensayo de sensibilidad *in vitro* MSF: Ensayo de fluorescencia para Malaria basado en el reactivo SYBR Green-**

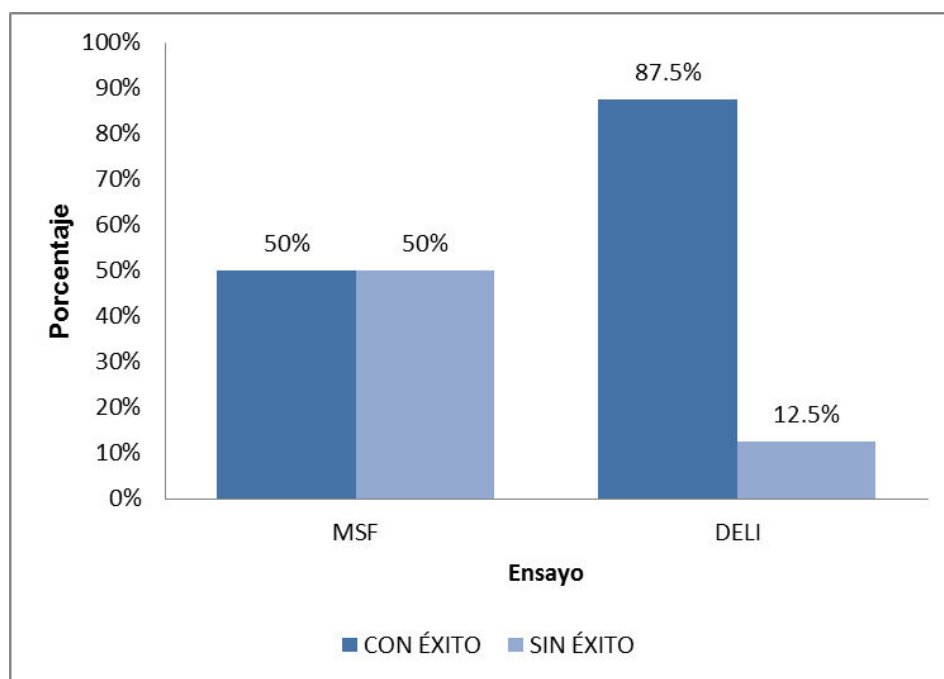
**I.**



### **3.2 PORCENTAJE DE ÉXITO DEL CÁLCULO DE IC50 SEGÚN ENSAYOS MSF Y DELI**

En el ensayo MSF se calculó la IC50 con éxito en el 50% (8/16) de las muestras y sin éxito en el 50% (8/16) de las muestras. Sin embargo, en el ensayo DELI se calculó la IC50 con éxito en el 87.5% (14/16) de las muestras y sin éxito 12.5% (2/16). En el **gráfico N°3** se observan los resultados de los porcentajes de éxito.

**Gráfico N°3. Porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* según ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF.**



Se evaluó la significancia del porcentaje de éxito del cálculo de IC50 del total de muestras de los ensayos DELI y MSF, mediante la prueba McNemar para muestras pareadas. Se consideró un ensayo con éxito en el cálculo de IC50 cuando para las tres drogas se calculó la IC50. En la **Tabla N°1**, se muestra el resultado de la prueba de McNemar del éxito de IC50 para las drogas CQ, QN y MQ según ensayos DELI y MSF.

**Tabla N°1. Porcentaje de éxito del cálculo de las IC50s de las drogas CQ, QN y MQ según ensayos DELI y MSF (n=16)**

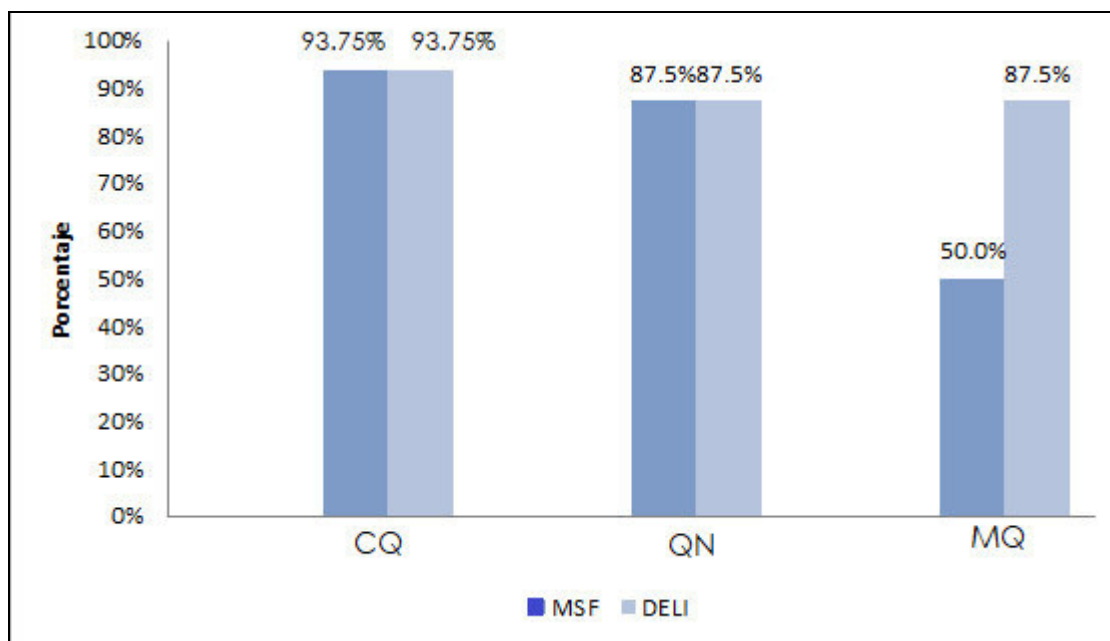
Resultado de IC50	MSF		DELI		Test McNemar
	n	%	n	%	
Con éxito	8	50	14	87.5	p < 0.001
Sin éxito	8	50	2	12.5	
Total	16	100	16	100	

El porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las pruebas MSF y DELI mediante la prueba de McNemar-Bowker fueron estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ )

### 3.3 PORCENTAJE DE ÉXITO DEL CÁLCULO DE IC50 DE MSF Y DELI SEGÚN DROGAS

El porcentaje de éxito para calcular la IC50 con el ensayo DELI para CQ fue 93.8% (15/16) y para QN y MQ fue 87.5% (14/16). El porcentaje de éxito para calcular la IC50 con ensayo MSF fue de 93.75% (15/16) para CQ, 87.5 % (14/16) para QN, y para la droga MQ fue de 50% (8/16). (Gráfico N°4)

**Gráfico N°4. Porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* según drogas.**



Se evaluó la significancia del porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 según drogas para ambos ensayos DELI y MSF, mediante la prueba McNemar-Bowker para muestras pareadas.

La significancia del porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de las pruebas MSF y DELI no fueron estadísticamente significativas para las drogas CQ y QN ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, las diferencias fueron significativas para la droga MQ ( $p < 0.05$ ).

### 3.4 COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN DE CURVAS (R2) DE LOS VALORES DE IC50 DE AMBOS ENSAYOS SEGÚN PARASITEMIA.

Las medias de los valores de R2 con el ensayo DELI fueron para cloroquina 0.89, quinina 0.92 y mefloquina 0.94; asimismo, las medias de los valores de R2 con el ensayo MSF fueron para cloroquina 0.78, quinina 0.94 y mefloquina 0.76 (Tabla N°2).

**Tabla N°2. Coeficiente de determinación de curvas (R2) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF (n=16).**

Ensayo	R2	n	Mínimo	Máximo	Media	Desviación estándar
<b>DELI</b>	CQ	15	0.52	0.98	0.89	0.13
	QN	14	0.58	1.00	0.92	0.12
	MQ	14	0.53	1.00	0.94	0.12
<b>MSF</b>	CQ	15	0.03	0.97	0.78	0.30
	QN	14	0.53	1.00	0.94	0.12
	MQ	8	0.58	0.95	0.76	0.15

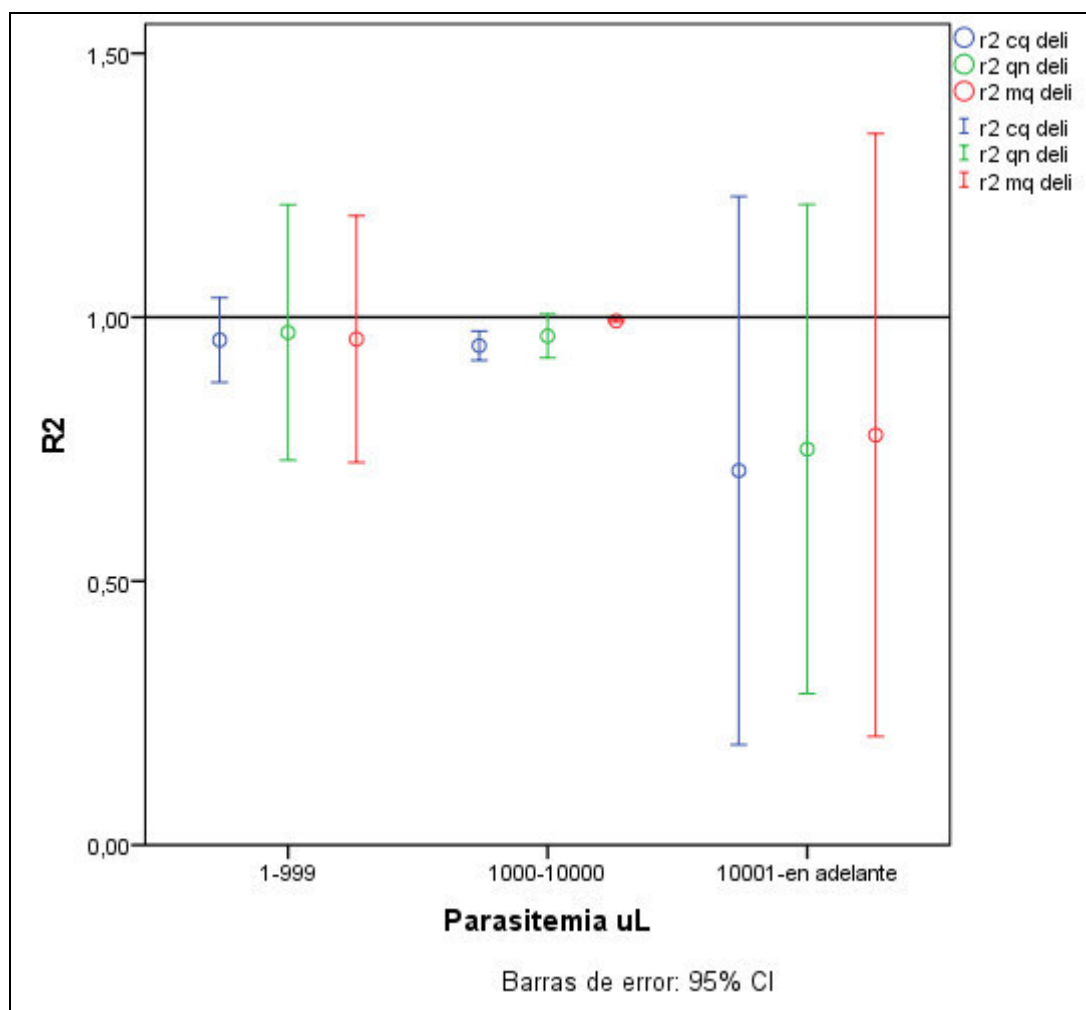
Se realizó la distribución de los valores de los coeficientes de determinación de curva de las IC50 calculadas para las tres drogas (CQ, QN y MQ) con ambos ensayos según el nivel de parasitemia.

El valor R2 más cercano a la unidad indica que los puntos de las concentraciones inhibitorias interceptan más a la curva de donde se determina la IC50, por lo tanto la IC50 es más precisa, mientras que los valores de R2 que más se alejan de la unidad indican que

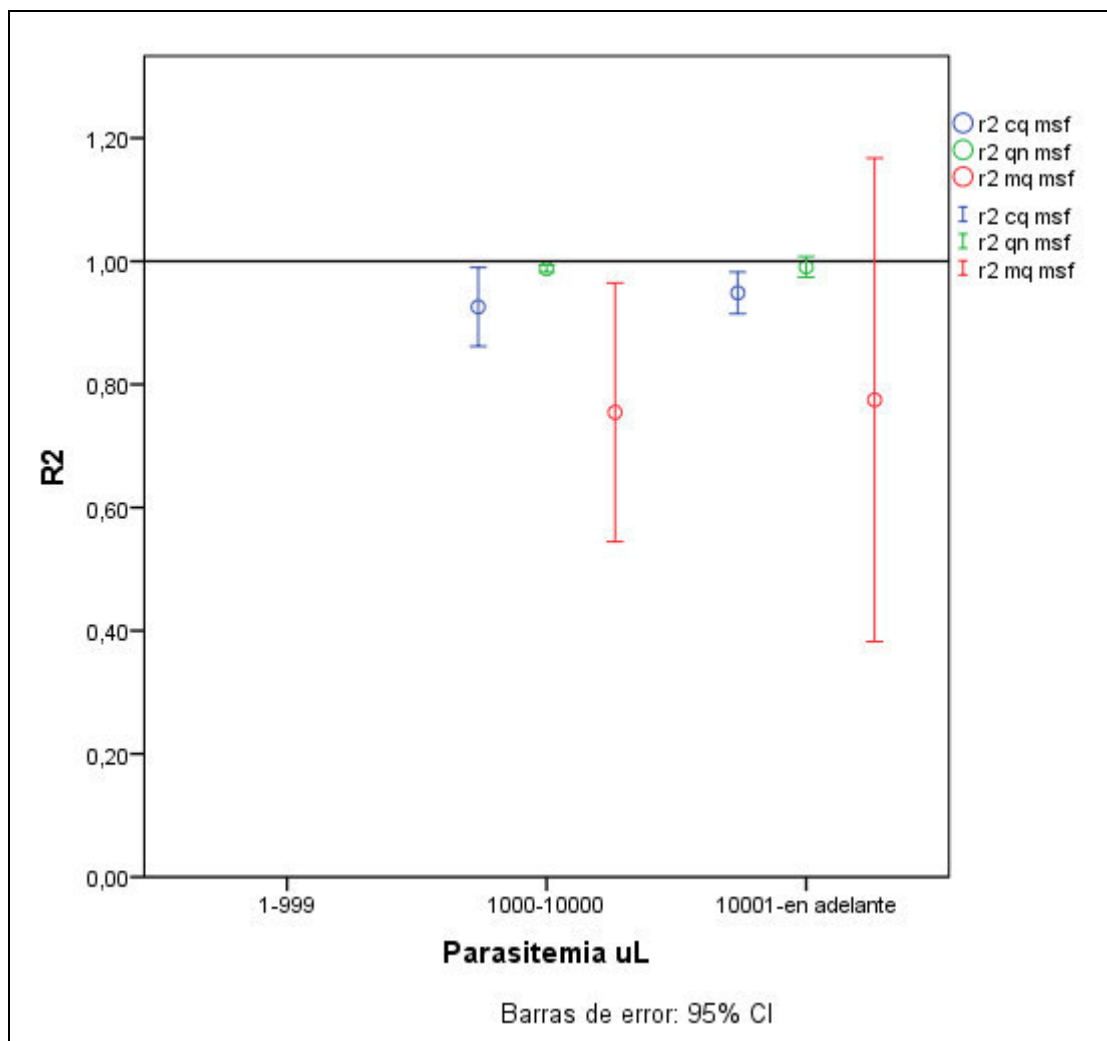
los puntos de las concentraciones inhibitorias interceptan menos a la curva y en consecuencia la IC50 es menos precisa.

En el **gráfico N°5** se observan los valores de R2 del ensayo DELI para parasitemias medias (11 muestras) en referencia a la unidad. Además, se observa los valores de R2 del ensayo DELI para parasitemias bajas (2 muestras) y parasitemias altas (3 muestras) en referencia a la unidad. Mientras que en el **gráfico N°6** se observa la distribución de los valores de R2 del ensayo MSF para parasitemias medias (11 muestras) en referencia a la unidad. Además se observan los valores de R2 del ensayo MSF para parasitemias bajas (2 muestras) y parasitemias altas (3 muestras) en referencia a la unidad.

**Gráfico N°5. Coeficientes de determinación de curva (R2) de CQ, QN y MQ del ensayo DELI según nivel de parasitemia.**



**Gráfico N°6. Coeficientes de determinación de curva (R2) de CQ, QN y MQ del ensayo MSF y según nivel de parasitemia.**



Así mismo se aplicó la prueba de Wilcoxon para comparar el rango medio de dos muestras relacionadas y poder determinar si existen diferencias entre los valores de  $R^2$  de los ensayos DELI y MSF (Tabla N°3).



**Tabla N°3. Evaluación de diferencias de los coeficientes de determinación de curvas (R2) entre los ensayos DELI y MSF mediante la prueba de Wilcoxon (n=16).**

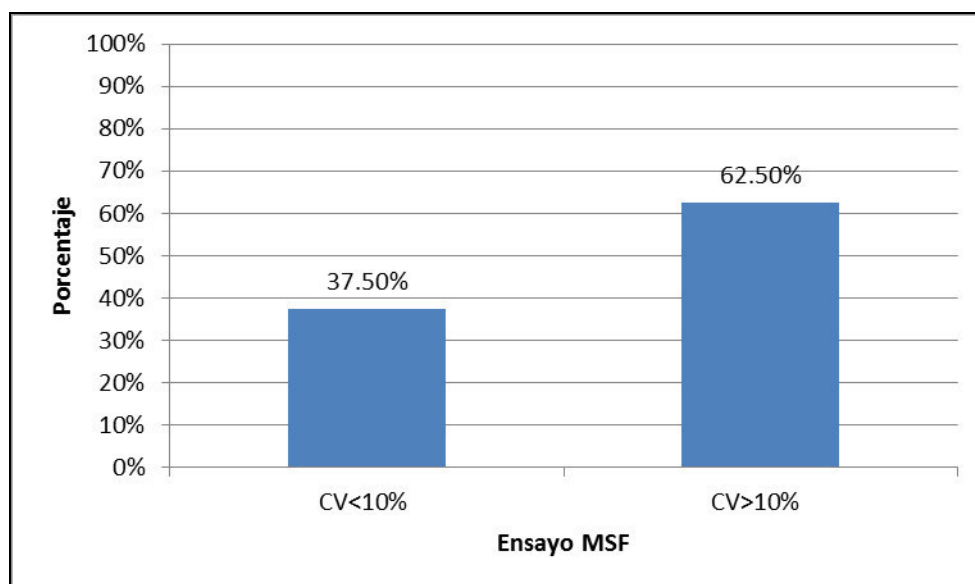
	<b>R2 CQ DELI - R2 CQ MSF</b>	<b>R2 QN DELI - R2 QN_ MSF</b>	<b>R2 MQ_ DELI - R2 MQ MSF</b>
<b>Z</b>	-1,136 <sup>b</sup>	-0,874 <sup>b</sup>	-1,820 <sup>b</sup>
<b>Sig. asintótica (bilateral)</b>	0,256	0,382	0,069

Con los resultados de la prueba Wilcoxon se puede afirmar que no existen diferencias significativas entre los valores de R2 de los ensayos DELI y MSF de cualquier droga ( $p > 0.05$ ).

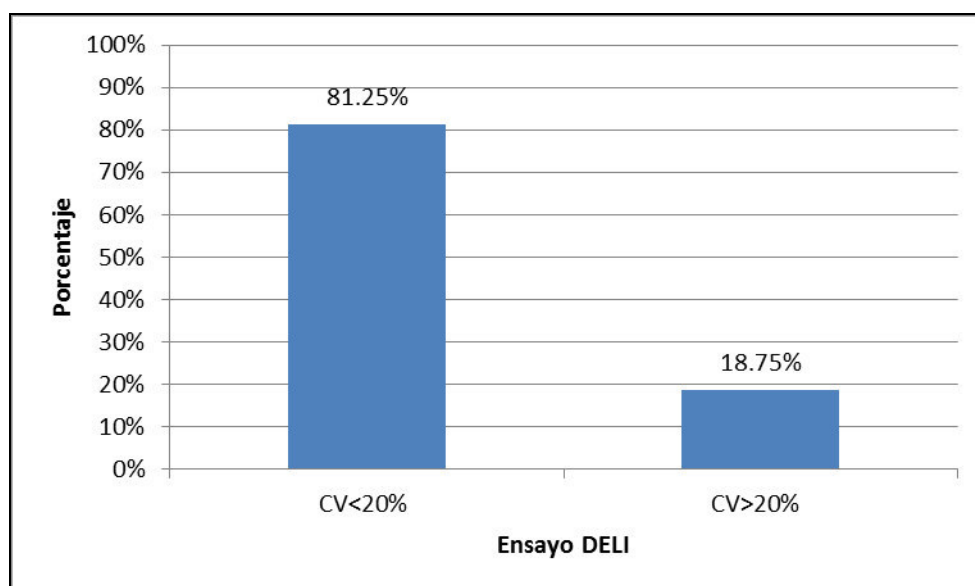
### **3.5 COEFICIENTE DE VARIACIÓN DE LAS LECTURAS DE UNIDADES DE FLUORESCENCIA RELATIVA (RFU) DEL ENSAYO MSF Y DENSIDAD ÓPTICA (DO) DEL ENSAYO DELI.**

En el **Gráfico N°7** se muestran los resultados de los coeficientes de variación de RFU del ensayo MSF donde el 37.5% (6/16) de los valores de las medidas de RFU tuvieron un CV < 10% y 62.5% (10/16) un CV > 10%. En el **Gráfico N°8** se muestran los resultados de los coeficientes de variación de las DO del ensayo DELI donde el 81.25% (13/16) de las medidas de DO tuvieron CV < 20% y 18.75% (3/16) un CV > 20%.

**Gráfico N°7. Frecuencias de los coeficientes de variación de RFU del ensayo MSF**



**Gráfico N°8. Frecuencias de los coeficientes de variación de DO del ensayo DELI.**



Finalmente se aplicó la prueba de McNemar para determinar que si existe diferencias significativas entre la frecuencia de datos negativos y positivos de ambos ensayos (Tabla N°4)

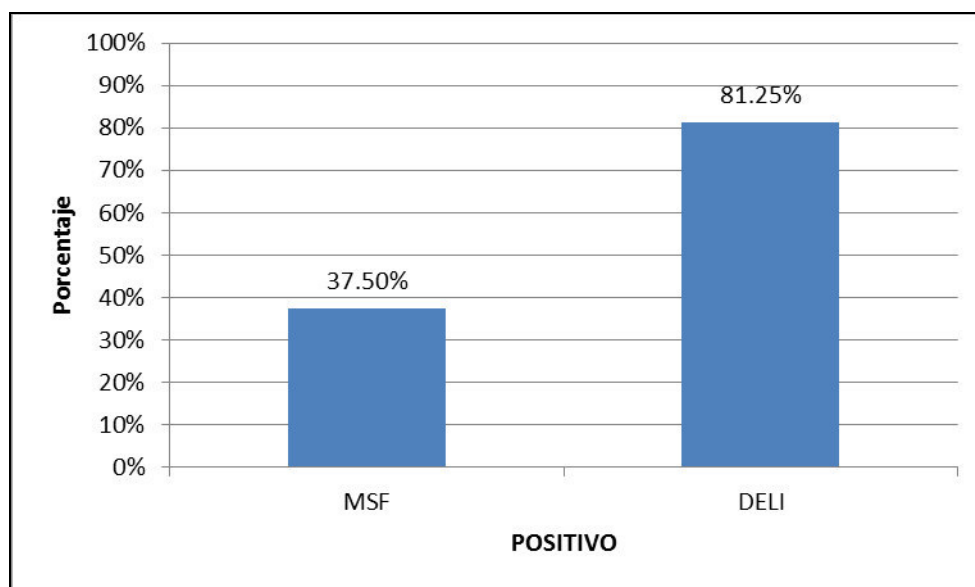
**Tabla N°4. Evaluación de diferencias de valores de CV entre los ensayos DELI y MSF mediante la prueba de McNemar (n=16).**

		CV DELI		Significación exacta
		positivo	negativo	
<b>CV MSF</b>	positivo	5	1	0.039
	negativo	8	2	
	Total	13	3	

Mediante la prueba de McNemar se encontró que el porcentaje de resultados positivos con el ensayo DELI fueron significativamente mayores que con el ensayo MSF ( $p < 0.05$ ), es decir, las variaciones encontradas en la proporción de resultados positivos observadas en la muestra no se deben al azar.

En el gráfico N°9 se compara el porcentaje de positivos con el ensayo DELI de 81.25% (13/16) y con el ensayo MSF de 37.5% (6/16).

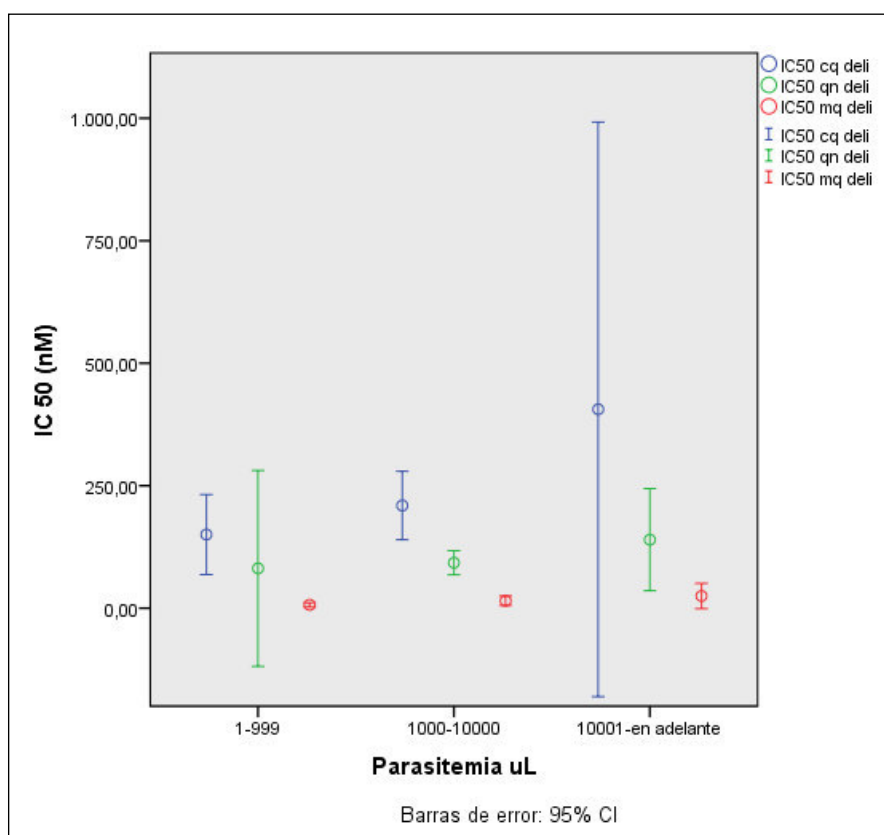
**Gráfico N°9. Comparación de los porcentajes de CV positivos con los ensayos MSF y DELI.**



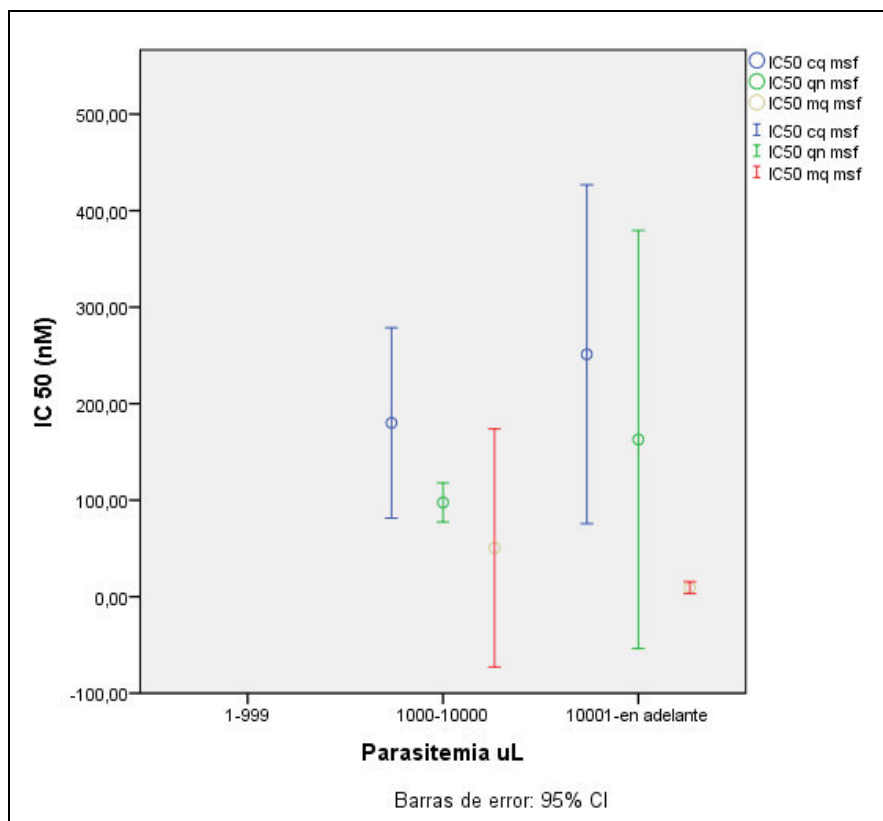
### 3.6. LA CONCENTRACIÓN INHIBITORIA MEDIA MÁXIMA (IC50) DE LAS DROGAS CQ, QN y MQ SEGÚN ENSAYO Y PARASITEMIA

Se realizó un gráfico de frecuencias del éxito del cálculo de IC50 de cada droga según el nivel de parasitemia baja (1-999 parásitos / $\mu$ L), media (1000-10000 parásitos / $\mu$ L), alta (10001 a más parásitos/ $\mu$ L). En el **gráfico N°10** se observa que mediante la prueba DELI si se logró calcular la IC50 en parasitemias baja, media o alta de cualquier droga. Sin embargo, en el **gráfico N°11** se observa que mediante la prueba MSF no se logra calcular las IC50 de las tres drogas en muestras con parasitemias bajas parasitemia (1-999 parásitos / $\mu$ L) y si se logra calcular el IC50 de las tres drogas en parasitemias media y altas. Sin embargo, el número de muestras con parasitemia baja (1-999 parásitos / $\mu$ L) es de 12.5% (2/16) del total de muestras, el número de muestras con parasitemia media es el 68.75% (11/16) y con parasitemias altas es de 18.75% (3/16) del total de muestras.

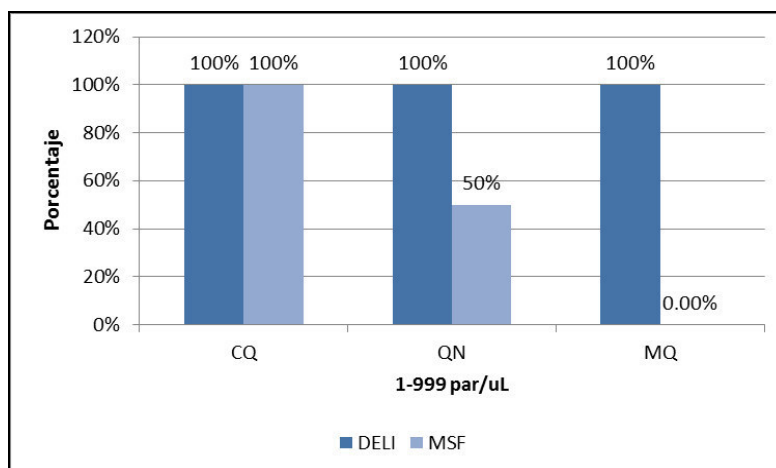
**Gráfico N°10. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* según ensayo DELI y nivel de parasitemia.**



**Gráfico N°11. Concentración inhibitoria media máxima (IC50) de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* según ensayo MSF y nivel de parasitemia.**



**Gráfico N°12. Porcentajes del éxito del cálculo de las IC50s de las drogas CQ, QN y MQ en muestras de *Plasmodium falciparum* evaluados con ensayos de sensibilidad *in vitro* DELI y MSF en parasitemias bajas.**



## **CAPITULO IV**

### **DISCUSIÓN**

Actualmente la prueba Gold Standard para los estudios de sensibilidad a drogas antimaláricas es la prueba de sensibilidad *in vivo*, la cual brinda una información valiosa de resistencia y susceptibilidad a drogas antimaláricas, y además sus resultados se usan para determinar y actualizar los programas de tratamientos. Los ensayos de susceptibilidad *in vitro*, así como los marcadores de resistencia son ensayos que proveen datos complementarios para la epidemiología de cepas resistentes a drogas antimaláricas. Sin embargo, no reemplazan a los estudios clínicos de resistencia a drogas ni predicen exactamente los resultados de resistencia a drogas para realizar cambios del tratamiento antimalárico (63).

Los ensayos de susceptibilidad existentes presentan diferentes marcadores de susceptibilidad como: producción de LDH (ensayo DELI), secreción de HRP2 (ensayo HRP2), detección de ADN (ensayo MSF) y cuantificación de esquizontes (ensayo microtest), los cuales reflejan los diferentes aspectos metabólicos o de maduración del parásito; por esta razón, los resultados de IC50 no son necesariamente directamente comparables entre las pruebas (63). En el presente estudio no se evaluó si los resultados se correlacionan o no entre sí, sino el interés radicó en saber cuál de las dos pruebas *in vitro* es más eficaz para el cálculo de la IC50 de CQ, QN y MQ. Para determinar la eficacia se usaron tres indicadores de eficacia dentro de cada ensayo (64, 69, 71).

El ensayo MSF ha sido ampliamente estudiado y se ha validado como un ensayo con valores de IC50 comparables a ensayos estándares como el ELISA HRP2 y el ensayo isotópico, pudiéndose usar tanto en cepas de referencia como en aislamientos frescos de *P. falciparum* (3, 71). En Perú, varias instituciones privadas con apoyo del Ministerio de Salud realizan estudios de sensibilidad a drogas antimaláricas mediante el ensayo MSF, debido a que no es laborioso y es de fácil implementación, sin embargo, la prueba presenta mucha lectura residual de fondo afectando la interpretación de los resultados y su especificidad (3).

Los estudios que evalúan el ensayo MSF, principalmente evalúan si los valores de IC50 son comparables a otras pruebas, como en el estudio de Smilkstein y col. (61), quienes compararon la similitud de los valores de IC50 entre los ensayos MSF e isotópico, y

afirmaron que los valores fueron similares; finalmente concluyeron que el ensayo MSF es un excelente método que puede sustituir al ensayo isotópico (61). Asimismo, en otro estudio Bacon y col. (3) evaluaron la variabilidad de los valores de IC50 de los ensayos MSF y HRP2 en varias condiciones de cultivo, con muestras frescas y cepas de referencias, y concluyeron que no hay diferencia significativa entre los valores de IC50, y sugirieron el uso de MSF como una prueba de sensibilidad a drogas antimaláricas (3). Sin embargo, la única investigación que se encontró que estudia la validación de los resultados de MSF fue realizada por Rason y col. (71).

Rason y col. en su estudio evaluaron 249 muestras de aislamiento clínico de *P. falciparum* con el objetivo de comparar resultados de IC50 de cuatro medicamentos (CQ, QN, AQ y ART), entre los resultados reportaron el porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 con el ensayo isotópico de 77.5% (193/249) y 81.5% (139/170) con el ensayo MSF (71). En el presente estudio con el ensayo MSF se obtuvo un éxito del cálculo de IC50 en las tres drogas (CQ, QN y MQ) de 50 % (8/16), mientras que con el ensayo DELI se obtuvo un éxito del cálculo de IC50 en las tres drogas de 87.5% (14/16), resultados diferentes a los que Rason y col. encontraron. Cuando se analizó estas diferencias del éxito total del cálculo del IC50 para las tres drogas (CQ, QN y MQ) las diferencias eran significativas ( $p < 0.05$ ).

Cuando se analizó el porcentaje de éxito según drogas, se encontró que los porcentajes de éxito para calcular la IC50 de CQ y QN fueron los mismos 93.75% y 87.5% respectivamente para ambos ensayos, pero si se encontraron diferencias entre los porcentajes de éxito del cálculo de la IC50 de MQ, los cuales fueron 50% y 87.5% para MSF y DELI respectivamente. Estos resultados con ambos análisis nos muestran que el ensayo MSF puede ser tan eficaz como el ensayo DELI, y la diferencia de su desempeño puede depender de la droga que se evalúe en el perfil de sensibilidad. Esta última hipótesis se apoya en los resultados encontrados por Rason y col. que encontraron un porcentaje de éxito del cálculo de la IC50 de 81.5% (139/170) para drogas diferentes a MQ como CQ, QN, AQ y ART (71).

De los resultados obtenidos en el éxito del cálculo de la IC50 en el estudio según drogas se demuestra que el ensayo DELI presentó una mejor sensibilidad (87.5%) para el cálculo de



la IC50 para MQ; mientras que el ensayo MSF presentó una sensibilidad de 50% en las drogas MQ; y en este último ensayo no se pudo calcular la IC50 para MQ en muestras con baja parasitemia ( $\sim 0.006\%$ ). Resultados semejantes fueron reportados en el estudio de Brasseur y col., quienes compararon la prueba DELI con la prueba Microtest para determinar la sensibilidad de CQ, QN, MQ y AS, y hallaron una mayor sensibilidad en el ensayo DELI que con el ensayo Microtest en muestras con parasitemias de 0.005% (5). Druilhe y col. en un estudio con 100 muestras compararon la sensibilidad de DELI y el ensayo isotópico y así mismo evaluaron la reproducibilidad de ambas pruebas. Encontraron que el nivel de detección de DELI fue de hasta 0.005% mientras que la prueba isotópica solo detectó parasitemias  $> 0.2\%$  (6).

En el presente estudio la diferencia entre los valores de R2 de los ensayos DELI y MSF no fueron estadísticamente diferentes ( $p > 0.05$ ), es decir, las curvas para el cálculo de la IC50 en el ensayo DELI fueron tan precisas como las curvas del ensayo MSF. No encontramos estudios donde comparen este indicador de eficacia entre pruebas de sensibilidad *in vitro* de sensibilidad a drogas anti-*P. falciparum*, sin embargo, es un valor que indica la precisión de los puntos que pasan por la curva de respuesta-inhibidor, de donde se calcula la IC50, y varios autores indican que el valor de R2 provee una medida de cuan bien los puntos se ajustan a la curva (69, 74).

Al comparar la variable coeficiente de variación de los valores de las medidas de lecturas de RFU, en el ensayo MSF, presentó mayor ocurrencia de CV mayores a 10% (10/16); mientras que las lecturas de DO, en el ensayo DELI, presentaron menores ocurrencias de CV mayores a 18.75% (3/16), estos resultados indican que el cálculo de la IC50 en el ensayo DELI es más preciso que el ensayo MSF, estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ). No encontramos estudios donde comparen este indicador de eficacia entre pruebas de sensibilidad *in vitro*.

En la comparación de las IC50s de las drogas antimaláricas según ensayo y nivel de parasitemia, se pudo observar que con el ensayo MSF las muestras con parasitemias bajas (1-999 parásitos / $\mu$ L), la sensibilidad para el cálculo de la IC50 se redujo a la mitad (50%) para las drogas CQ (1/2) y no se logró calcular para la droga MQ (0/2); sin embargo, con el

ensayo DELI se logró calcular el 100% (2/2) para todas las drogas. No encontramos estudios donde comparen este indicador de eficacia entre pruebas de sensibilidad *in vitro*.

Cuando se evaluó la significancia de los resultados del indicador “porcentaje de éxito del cálculo de IC50” según drogas para ambos ensayos no se encontraron diferencias significativas entre las drogas CQ y QN, sin embargo si hubo diferencias significativas para la droga MQ con ambas pruebas. Esto significa que se reduce el cálculo de la IC50 para MQ mediante la prueba MSF originando perfiles de sensibilidad incompletos, lo cual es una desventaja transcendental frente a la prueba DELI; debido a que la droga MQ es una de las drogas más importantes en el contexto epidemiológico de Iquitos. Por tal motivo se consideró que la prueba DELI también fue superior en la valoración de este indicador, a pesar que con las drogas CQ y QN este indicador no presentó diferencias significativas.

La diferencia de éxito del cálculo de la IC50 entre MQ y CQ o QN para ambas pruebas puede deberse a que para calcular la IC50 de MQ, el tiempo de incubación del parásito en el ensayo *in vitro* (48 horas) para esta droga sea insuficiente para poder evidenciar las concentraciones de ADN por el ensayo MSF, considerando que un ciclo de vida del parásito dura 48 horas (78). Por consiguiente, errores en el tiempo de incubación *in vitro* de los ensayos podrían producir insuficiente tiempo de incubación para un ciclo de vida del parásito originando ausencia de ADN o incipientes concentraciones de ADN para calcular el IC50 de MQ mediante el ensayo MSF, sin embargo, los cálculos del IC50 de CQ y QN no se verían afectados. Es decir, este posible error en el tiempo de incubación no afectaría en la determinación de las IC50 de la droga MQ por parte del ensayo DELI. Esto último nos indica que calcular la enzima lactato-deshidrogenasa como un indicador de sensibilidad *in vitro* le suma sensibilidad al propio ensayo DELI. Por otro lado, las concentraciones de la droga MQ en ambos ensayos fueron catorce veces menos en comparación con las concentraciones de las drogas CQ y QN, esta diferencia de concentración de MQ puede influir en la sensibilidad para el cálculo de la IC50 en el ensayo MSF imposibilitando el cálculo de IC50 por este ensayo.

Los resultados obtenidos en los indicadores “porcentaje de éxito del cálculo de IC50” y “coeficiente de variación (CV)” indican que la prueba DELI es superior en estos dos

indicadores. Por otro lado, con el indicador “coeficiente de determinación de curvas ( $R^2$ )” los resultados no fueron estadísticamente diferentes para las drogas CQ, QN y MQ, esto significa que para este indicador no hay diferencias en la precisión entre las curvas de los ensayos MSF y DELI para nuestra muestra de estudio ( $n=16$ ).

En base a los resultados que se obtuvieron en al menos dos indicadores de eficacia se determinó que la prueba DELI es una prueba eficaz para el cálculo de IC50.

Una limitación importante de este estudio es el tamaño de muestra que se recolectó y la falta de proporcionalidad entre el número de muestras y los diferentes niveles de parasitemias.

Otra limitación de este estudio fue que solo se evaluó la sensibilidad a dos drogas actualmente usadas en la Amazonia Peruana para el tratamiento de malaria no complicada por *P. falciparum*, una droga de primera línea (MQ) y otra de segunda línea (QN); y no se evaluó la sensibilidad de *P. falciparum* a AS, o a otras drogas de segunda línea como CL y PQ.

**CAPITULO V**  
**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## CONCLUSIONES

El estudio realizado tuvo las siguientes conclusiones:

- El porcentaje de éxito del cálculo de IC50 para las tres drogas (CQ, QN y MQ) mediante el ensayo DELI fue mayor al del ensayo MSF.
- Los resultados de coeficiente de determinación de curva ( $R^2$ ) de ambos ensayos indican que las IC50s de los ensayos DELI fueron tan precisos como las IC50s de los ensayos MSF.
- La comparación del coeficiente de variación de las lecturas de ambos ensayos indica que los valores de DO del ensayo DELI fueron más precisos que los valores de RFU en el ensayo MSF.
- El ensayo DELI es más sensible para detectar IC50 de la droga MQ.
- El ensayo DELI es más eficaz para calcular la IC50 de drogas antimaláricas CQ, QN y MQ.

## RECOMENDACIONES

- Desarrollar más estudios con mayor tamaño muestral para definir el porcentaje de éxito y otras variables con mayor verosimilitud. Así como mayor proporción en las muestras de diferentes niveles de concentración de parásitos.
- Incluir otros indicadores en el análisis de curvas que determinen una mayor exactitud para determinar la eficacia del cálculo de IC50.
- Usar el ensayo DELI en lugar del ensayo MSF para estudios de sensibilidad a drogas antimaláricas donde se incluya la droga MQ.
- Evaluar otras condiciones de pureza de las muestras, como por ejemplo estudios comparativos de muestras seriadas con filtración y sin filtración de leucocitos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bloland PB. Drug resistance in malaria. WHO: World Health Organization. Anti-Infective Drug Resistance Surveillance and Containment Team; 2001. [consultado 10 de abril 2018]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66847/WHO\\_CDS\\_CSR\\_DRS\\_2001.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/66847/WHO_CDS_CSR_DRS_2001.4.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
2. Ringwald P. Assessment and monitoring of antimalarial drug efficacy for the treatment of uncomplicated falciparum malaria. Geneva:WHO; 2003. [consultado 10 de abril 2018]. Disponible en: [https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug\\_resistance/who2003\\_monitoring.pdf](https://www.cdc.gov/malaria/resources/pdf/drug_resistance/who2003_monitoring.pdf)
3. Bacon DJ, Latour C, Lucas C, Colina O, Ringwald P, Picot S. Comparison of a SYBR green I-based assay with a histidine-rich protein II enzyme-linked immunosorbent assay for in vitro antimalarial drug efficacy testing and application to clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(4):1172-8.
4. Noedl H, Wernsdorfer WH, Miller RS, Wongsrichanalai C. Histidine-rich protein II: a novel approach to malaria drug sensitivity testing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(6):1658-64
5. Brasseur P, Agnamey P, Moreno A, Druilhe P. Evaluation of in vitro drug sensitivity of antimalarials for *Plasmodium falciparum* using a colorimetric assay (DELI-microtest). *Med Trop (Mars).* 2001;61(6):545-47.
6. Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P. A colorimetric in vitro drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site lactate dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg.* 2001;64(5-6):233-41.
7. Kaddouri H, Nakache S, Houze S, Mentre F, Le Bras J. Assessment of the drug susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates from africa by using a *Plasmodium* lactate dehydrogenase immunodetection assay and an inhibitory maximum effect model for precise measurement of the 50-percent inhibitory concentration. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(10):3343-9.
8. OPS. Utilización de las pruebas de susceptibilidad in vitro en la vigilancia de la resistencia a los antimaláricos en RAVREDA-AMI: Lineamientos propuestos en una reunión técnica sobre la estandarización del uso de pruebas *in vitro* en RAVREDA-AMI. Washington DC: OPS; 2004. [consultado 30 de abril 2018]. Disponible en: <http://www.paho.org/spanish/ad/dpc/cd/ravreda3-pruebas-in-vitro.doc>
9. Neyra D, Cabezas C, Ruebush TK. El proceso de adecuación y cambio en la política del tratamiento de la Malaria por *Plasmodium falciparum*. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2003;20(3):162-71.
10. MINSA. Norma Técnica para la atención curativa de la malaria esquemas terapéuticos en el tratamiento de la malaria no complicada y malaria grave en el Perú. DGS; 2005. [consultado 30 de abril 2018]. Disponible en: <http://www.diresacajamarca.gob.pe/sites/default/files/NTS%20Malaria.pdf>

11. Price RN, Nosten F, Luxemburger C, ter Kuile FO, Paiphun L, Chongsuphajaisiddhi T, et al. Effects of artemisinin derivatives on malaria transmissibility. *Lancet*. 1996;347:1654-8.
12. DGE. Resumen de las enfermedades o eventos bajo vigilancia epidemiológica en el Perú, del 28 de Diciembre del 2014 al 03 de Enero de 2015. *Bol Epidemiol (Lima)*. 2014; 23(53): 1044-48. [consultado 30 de noviembre 2018]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2014/53.pdf>
13. de Souza JM. A phase I clinical trial of mefloquine in Brazilian male subjects. *Bull World Health Organ*. 1983;61(5):809-14.
14. Durand S, Sihuíncha M, Lachira A, Chaves J, Cabezas C. Necesidad de vigilar la resistencia del *P. falciparum* al artesunato en el Perú. A need to monitor *P. falciparum* resistance to artesunate in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2012;29(4):578-85.
15. World Health Organization (WHO). World malaria report 2014. WHO Global Malaria Programme, 2014. [consultado 30 de abril 2018]. Disponible en: [https://www.who.int/malaria/publications/world\\_malaria\\_report\\_2014/en/](https://www.who.int/malaria/publications/world_malaria_report_2014/en/)
16. Baumeister S, Winterberg M, Przyborski JM, Lingelbach K. The malaria parasite *Plasmodium falciparum*: cell biological peculiarities and nutritional consequences. *Protoplasma*. 2010;240(1-4):3-12.
17. Tuteja R. Malaria - an overview. *FEBS J*. 2007;274(18):4670-9.
18. Bousema T, Okell L, Felger I, Drakeley C. Asymptomatic malaria infections: detectability, transmissibility and public health relevance. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(12):833-40.
19. Miller LH, Baruch DI, Marsh K, Doumbo OK. The pathogenic basis of malaria. *Nature*. 2002;415:673-9.
20. Gomes AP, Vitorino RR, Costa AD, Mendonça EG, Oliveira MG, Siqueira-Batista R. Severe *Plasmodium falciparum* malaria. *Rev Bras Ter Intensiva*. 2011;23(3):358-69.
21. Aramburu Guarda J, Ramal Asayag C, Witzig R. Malaria reemergence in the Peruvian Amazon region. *Emerg Infect Dis*. 1999;5(2):209-15.
22. Guzmán J. Situación Epidemiológica en el Perú, SE09. *Boletín Epidemiológico (Lima-Perú)*. Lima: Ministerio de Salud; 2016, 158-60. [consultado 30 de abril 2018]. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/portal/docs/vigilancia/boletines/2016/09.pdf>
23. Autino B, Noris A, Russo R, Castelli F. Epidemiology of malaria in endemic areas. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2012;4(1):e2012060. [consultado 20 de abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3499992/pdf/mjh4-1-2012060.pdf>
24. White NJ. The Treatment of Malaria. *N Engl J Med*. 1996;335(11):800-6.
25. Klein EY. Antimalarial drug resistance: a review of the biology and strategies to delay emergence and spread. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(4):311-7.
26. CDC. The history of malaria, an ancient disease. Atlanta, USA: Global Health—Division of Parasitic Diseases and Malaria; 2012. [consultado 20 de abril 2018]. Disponible en: <https://www.cdc.gov/malaria/about/history>

27. Wishart DS, Knox C, Guo AC, Shrivastava S, Hassanali M, Stothard P, et al. DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:D668-72.
28. Guidelines for the Treatment of Malaria. 3rd edition. Geneva: World Health Organization; 2015. [consultado 20 de abril 2018]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK294440/>
29. Bustamante LY, Giraldo LE. Cloroquina: hipótesis acerca de los mecanismos de resistencia en *Plasmodium falciparum*. *Biomedica.* 1999;19(1):18-24.
30. Achan J, Talisuna AO, Erhart A, Yeka A, Tibenderana JK, Baliraine FN, et al. Quinine, an old anti-malarial drug in a modern world: role in the treatment of malaria. *Malar J.* 2011;10:144. doi: 10.1186/1475-2875-10-144.
31. World Health Organization (WHO). Guidelines for the treatment of malaria. Geneva: WHO; 2015. [consultado 5 de mayo 2018]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127\\_eng.pdf?sequence=1](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/162441/9789241549127_eng.pdf?sequence=1)
32. Foley M, Tilley L. Quinoline antimalarials: mechanisms of action and resistance. *Int J Parasitol.* 1998;27(2):231-40.
33. Palmer KJ, Holliday SM, Brogden RN. Mefloquine. A review of its antimalarial activity, pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1993;45(3):430-75.
34. Talisuna AO, Bloland P, D'Alessandro U. History, dynamics, and public health importance of malaria parasite resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(1):235-54.
35. Gregson A, Plowe CV. Mechanisms of resistance of malaria parasites to antifolates. *Pharmacol Rev.* 2005;57(1):117-45.
36. Packard RM. The origins of antimalarial-drug resistance. *N Engl J Med.* 2014;371(5):397-9.
37. Cortese JF, Caraballo A, Contreras CE, Plowe CV. Origin and dissemination of *Plasmodium falciparum* drug-resistance mutations in South America. *J Infect Dis.* 2002;186(7):999-1006.
38. Parekh FK, Hernandez JN, Krogstad DJ, Casapia WM, Branch OH. Prevalence and Risk of *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* Malaria among Pregnant Women Living in the Hypoendemic Communities of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2007;77(3):451-7.
39. Roper MH, Torres RS, Goicochea CG, Andersen EM, Guarda JS, Calampa C, et al. The epidemiology of malaria in an epidemic area of the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2000;62(2):247-56.
40. Parija SC, Praharaj I. Drug resistance in malaria. *Indian J Med Microbiol.* 2011;29(3):243-8.
41. Breman JG, Alilio MS, White NJ. Defining and Defeating the Intolerable Burden of Malaria III: Progress and Perspectives. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77(6):6-11
42. White NJ. Assessment of the pharmacodynamic properties of antimalarial drugs in vivo. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(7):1413-22.
43. Targett G, Drakeley C, Jawara M, von Seidlein L, Coleman R, Deen J, et al. Artesunate reduces but does not prevent posttreatment transmission of *Plasmodium falciparum* to *Anopheles gambiae*. *J Infect Dis.* 2001;183(8):1254-9.



44. White N. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1999;354:739-49.
45. Delhi N. Directorate of National Vector Borne Disease Control Programme. National Drug Policy on Malaria; 2013.1-1554. [consultado 5 de mayo 2018]. Disponible en: <https://nvbdcp.gov.in/Doc/drug-policy-08.pdf>
46. Antony HA, Parija SC. Antimalarial drug resistance: An overview. *Trop Parasitol.* 2016;6(1):30-41.
47. Hastings IM, Watkins WM, White NJ. The evolution of drug-resistant malaria: the role of drug elimination half-life. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2002;357(1420):505-19.
48. World Health Organization (WHO). Update WHO Policy Recommendation. Global Malaria Programme; 2012. Disponible en: [http://www.who.int/malaria/mpac/sep2012/primaquine\\_single\\_dose\\_pf\\_erg\\_meeting\\_report\\_aug2012.pdf](http://www.who.int/malaria/mpac/sep2012/primaquine_single_dose_pf_erg_meeting_report_aug2012.pdf).
49. World Health Organization (WHO). Policy brief on single-dose primaquine as a gametocytocide in *Plasmodium falciparum* malaria: Global Malaria Programme; 2015;1-8 Disponible en: [www.who.int/malaria/mpac/sep2012/primaquine\\_single\\_dose\\_pf\\_erg\\_meeting\\_report\\_aug2012.pdf](http://www.who.int/malaria/mpac/sep2012/primaquine_single_dose_pf_erg_meeting_report_aug2012.pdf).
50. Ashley EA, Dhorda M, Fairhurst RM, Amaratunga C, Lim P, Suon S, et al. Spread of artemisinin resistance in *Plasmodium falciparum* malaria. *N Engl J Med.* 2014;371(5):411-23.
51. Ruebush TK, Neyra D, Cabezas C. Modifying national malaria treatment policies in Peru. *J Public Health Pol.* 2004;25(3-4):328-45. <https://doi.org/10.1057/palgrave.jphp.3190032>
52. Marquino W, MacArthur JR, Barat LM, Oblitas FE, Arrunategui M, Garavito G, et al. Efficacy of chloroquine, sulfadoxine-pyrimethamine, and mefloquine for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria on the north coast of Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2003;68(1):120-3.
53. MINSA. Resistencia del *Plasmodium falciparum* a medicamentos antimaláricos en el Perú, Proyecto VIGIA. Ministerio de Salud del Perú. 1999. [consultado 5 de mayo 2018]. Disponible en: <http://bvs.minsa.gob.pe/local/minsa/1765.pdf>
54. Marquino W, Ylquimiche L, Hermenegildo Y, Palacios AM, Falconi E, Cabezas C, et al. Efficacy and tolerability of artesunate plus sulfadoxine-pyrimethamine and sulfadoxine-pyrimethamine alone for the treatment of uncomplicated *Plasmodium falciparum* malaria in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 2005;72(5):568-72.
55. Sánchez MC, Durand VS. Costo efectividad del cambio de los esquemas de tratamiento para malaria en el Perú (1999-2003). *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2004;21(4):197-209.
56. Durand S, Lachira-Alban A, Cabezas C. Impacto de diferentes esquemas terapéuticos sobre la malaria en la costa y amazonia peruana, en el marco de una política de medicamentos antimaláricos, 1994-2017. *Rev Peru Med Exp Salud Publica* 2018;35(3):497-504.
57. Makler MT, Ries LK, Ries J, Horton RJ, Hinrichs DJ. Detection of *Plasmodium falciparum* Infection with the Fluorescent Dye, Benzothiocarboxypurine. *Am J Trop Med Hyg.* 1991;44(1):11-6.

58. Nikbakht H, Xia X, Hickey DA. The evolution of genomic GC content undergoes a rapid reversal within the genus *Plasmodium*. *Genome*. 2014;57(9):507-11.
59. Zipper H, Brunner H, Bernhagen J, Vitzthum F. Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(12):e103.
60. Briggs C, Jones M. SYBR Green I-induced fluorescence in cultured immune cells: a comparison with Acridine Orange. *Acta Histochem*. 2005;107(4):301-12.
61. Smilkstein M, Sriwilaijaroen N, Kelly JX, Wilairat P, Riscoe M. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1803-6.
62. Bennett TN, Paguio M, Gligorijevic B, Seudieu C, Kosar AD, Davidson E, et al. Novel, rapid, and inexpensive cell-based quantification of antimalarial drug efficacy. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(5):1807-10.
63. Basco L. Field application of in vitro assays for the sensitivity of human malaria parasites to antimalarial drugs. Geneva: World Health Organization. 2007. [consultado 5 de mayo 2018]. Disponible en: [https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43610/9789241595155\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/43610/9789241595155_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)
64. Caldwell GW, Yan Z, Lang W, Masucci JA. The IC(50) concept revisited. *Curr Top Med Chem*. 2012;12(11):1282-90.
65. Neubig RR, Spedding M, Kenakin T, Christopoulos A. International Union of Pharmacology Committee on Receptor Nomenclature and Drug Classification. XXXVIII. Update on terms and symbols in quantitative pharmacology. *Pharmacol Rev*. 2003;55(4):597-606.
66. Woodrow CJ, Wangsing C, Sriprawat K, al. e. Comparison between Flow Cytometry, Microscopy, and Lactate Dehydrogenase-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for *Plasmodium falciparum* Drug Susceptibility Testing under Field Conditions. *J Clin Microbiol*. 2015;53(10):3296-303.
67. GraphPad Software [Internet]. GraphPad Curve Fitting Guide. [consultado 30 de noviembre 2018]. Disponible en: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg\\_50\\_of\\_what\\_\\_relative\\_vs\\_absolu.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_50_of_what__relative_vs_absolu.htm)
68. Jarantow SW, Bushey BS, Pardinas JR, Boakye K, Lacy ER, Sanders R, et al. Impact of Cell-surface Antigen Expression on Target Engagement and Function of an Epidermal Growth Factor Receptor x c-MET Bispecific Antibody. *J Biol Chem*. 2015;290(41):24689-704.
69. Kvalseth TO. Cautionary Note about R2. *Am Stat*. 1985;39(4):279-85. Doi: 10.1080/00031305.1985.10479448
70. Witkowski B, Amaratunga C, Khim N, Sreng S, Chim P, Kim S, et al. Novel phenotypic assays for the detection of artemisinin-resistant *Plasmodium falciparum* malaria in Cambodia: in-vitro and ex-vivo drug-response studies. *Lancet Infect Dis*. 2013;13(12):1043-9.
71. Rason MA, Randrianantsoa T, Andrianantenaina H, Ratsimbaoa A, Menard D. Performance and reliability of the SYBR Green I based assay for the routine monitoring of susceptibility of *Plasmodium falciparum* clinical isolates. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102(4):346-51.

72. Reed GF, Lynn F, Meade BD. Use of coefficient of variation in assessing variability of quantitative assays. Clin Diagn Lab Immunol. 2002;9(6):1235-9.
73. Lynn F, Reed GF, Meade BD. Collaborative study for the evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays used to measure human antibodies to *Bordetella pertussis* antigens. Clin Diagn Lab Immunol. 1996;3(6):689-700.
74. Motulsky H, Christopoulos A. Fitting Models to Biological Data Using Linear and Nonlinear Regression. A Practical Guide to Curve Fitting; 2004. [consultado 5 de mayo 2018]. Disponible en: <http://www.facm.ucl.ac.be/cooperation/Vietnam/WBI-Vietnam-October-2011/Modelling/RegressionBook.pdf>
75. GraphPad Software [Internet]. GraphPad Curve Fitting Guide. [consultado 30 de noviembre 2018]. Disponible en: [https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg\\_intepretingnonlinr2.htm](https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/index.htm?reg_intepretingnonlinr2.htm)
76. Group. USC. 2018. [consultado 30 de noviembre 2018]. Disponible en: <https://stats.idre.ucla.edu/sas/modules/sas-learning-moduleintroduction-to-the-features-of-sas/>.
77. García-García JA, Reding-Bernal A, López-Alvarenga JC. Cálculo del tamaño de la muestra en investigación en educación médica. Inv Ed Med. 2013;2(8):217-24.
78. Zaloumis S, Humberstone A, Charman SA, Price RN, Moehrle J, Gamo-Benito J, et al. Assessing the utility of an anti-malarial pharmacokinetic-pharmacodynamic model for aiding drug clinical development. Malar J. 2012;11:303.

## ANEXO 1

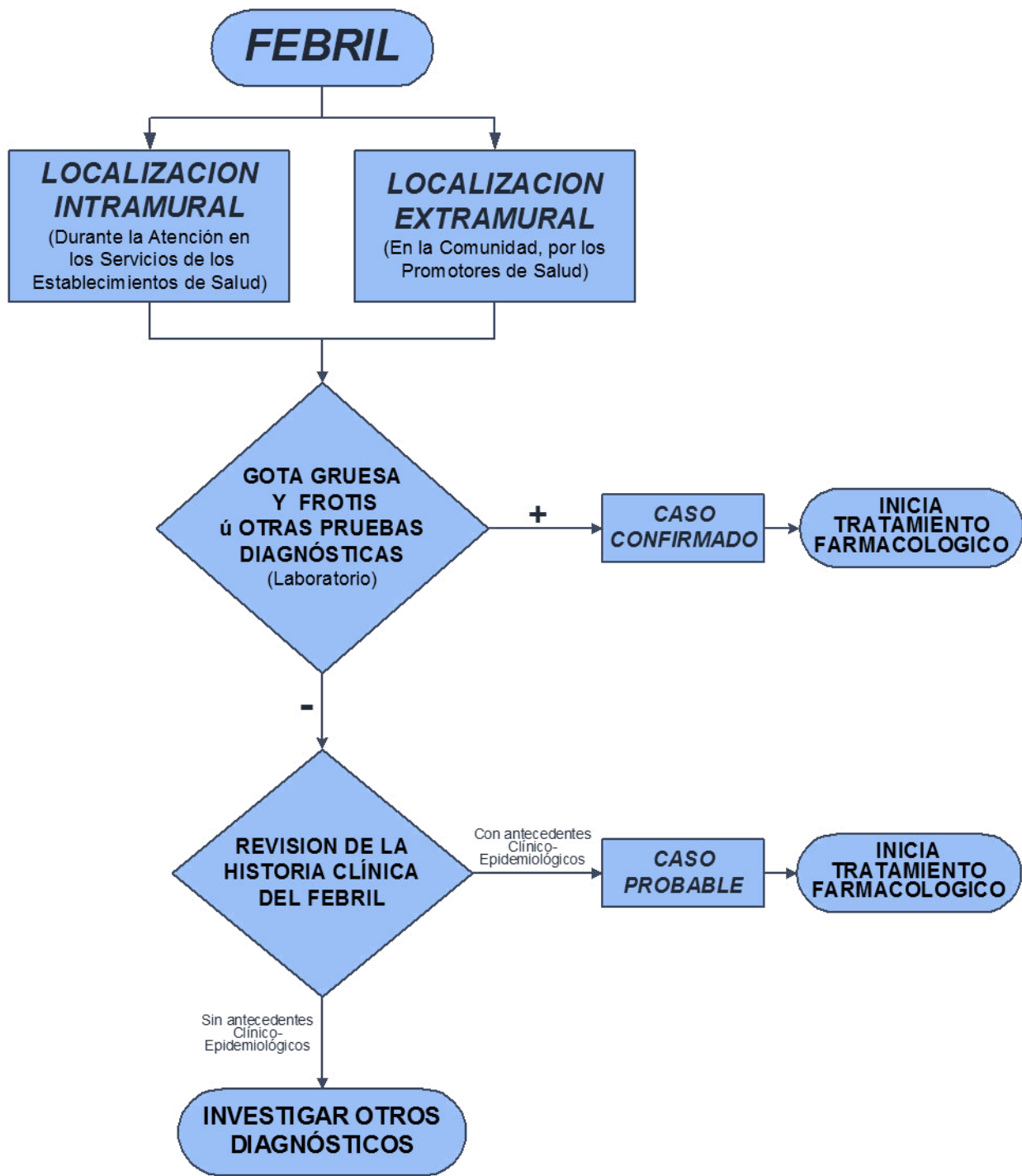
### FICHA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

REGISTRO DE RESULTADOS DE MUESTRAS DELI												
MUESTRA	CÓDIGO	FECHA	RESULTADO DELI (IC50)									
			Parasitemia	IC50				ANÁLISIS DE CURVAS (r2)			CV DE LECTURAS	
				X IC50-CQ	X IC50-QN	X IC50-MQ	ÉXITO DEL CÁLCULO IC50	CQ	QN	MQ	<20%	>20%

REGISTRO DE RESULTADOS DE MUESTRAS MSF												
MUESTRA	CÓDIGO	FECHA	RESULTADO MSF (IC50)									
			Parasitemia	IC50				ANÁLISIS DE CURVAS (r2)			CV DE LECTURAS	
				X IC50-CQ24h	X IC50-QN24h	X IC50-MQ24h	ÉXITO DEL CÁLCULO IC50	CQ	QN	MQ	<10%	>10%

## ANEXO 2

### FLUXOGRAMA DE LOCALIZACIÓN Y ATENCIÓN DE FEBRILES EN SERVICIOS GENERALES DE SALUD



## ANEXO 3

### CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO Y ASENTIMIENTO PARA EL USO FUTURO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS

Versión: 12 de Agosto del 2011

Anexo 1 – Consentimiento Escrito

#### CONSENTIMIENTO INFORMADO ESCRITO

Título del Estudio: Distribución de la Malaria en el Perú

CEI NAMRU-6  
PERU  
N° de Protocolo: NMRCD 2007.0004  
Fecha de Aprobación: 20/08/12  
Fecha de Expiración: 08/08/13  
Verificado por: ZM

#### Introducción y Propósito

El Ministerio de Salud del Perú junto con el Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6) en Perú, quieren encontrar una mejor manera de caracterizar los tipos de malaria que afectan a la población peruana. Con esta finalidad, estamos realizando un estudio de investigación en pacientes con malaria. Todos los casos de malaria ya sea que participen en el estudio o no serán tratados según la especie de malaria con la que están infectados y de acuerdo a las políticas estándares de tratamiento del Ministerio de Salud del Perú. El responsable de este estudio del NAMRU-6 es la Dra. Kimberly A. Edgel. Le solicitamos su participación en este estudio para conocer el tipo de malaria que padece.

#### Procedimientos

Si se le ha diagnosticado malaria a usted/su hijo(a)/su dependiente, entonces se le preguntará si es que usted/su hijo(a)/su dependiente estaría(n) interesado en participar en este estudio. Si acepta participar en este estudio, le haremos preguntas sobre su salud/la salud de su hijo(a)/la salud de su dependiente, algún viaje reciente, sus anteriores infecciones de malaria y un breve examen médico. Adicionalmente le solicitaremos proveernos de una muestra de sangre para determinar si usted/su hijo(a)/su dependiente tiene malaria, para evaluar si hay resistencia a los medicamentos antimaláricos, conocer los diferentes tipos de malaria existentes, evaluar las defensas de su cuerpo (pruebas inmunológicas) y realizar exámenes médicos adicionales relacionados con el estudio actual. Si el establecimiento de salud que usted está visitando tiene electricidad las 24 horas y cuenta con un congelador, entonces le solicitaremos que usted/su hijo(a)/su dependiente proporcione 7 ml. de sangre (equivalente a 1 cucharada de sopa), de lo contrario le tomaremos una pequeña muestra (1 ml) de su dedo/el dedo de su hijo/el dedo de su dependiente y la pondremos sobre un pedazo de papel especial. Todos los voluntarios que participen en el estudio y que hayan sido diagnosticados con malaria serán tratados por el establecimiento de salud. Si usted/su hijo(a)/su dependiente no tiene malaria, el médico lo tratará después de realizarle un examen. Si es que usted/su hijo(a)/su dependiente no mejora dentro de los 35 días y regresa a la clínica, le tomaremos una segunda muestra de sangre (7 ml) y le haremos una serie de preguntas relacionadas con su enfermedad/la enfermedad de su hijo/la enfermedad de su dependiente. Por favor, regrese a la clínica en cualquier momento si es que usted/su hijo(a)/su dependiente no se siente mejor.

#### Participación voluntaria y alternativas de tratamiento

La participación en este estudio es voluntaria y no le costará nada a usted ni a su familia. Asimismo, usted puede retirarse del estudio cuando lo desee y por el motivo que crea conveniente sin perder sus derechos a recibir el tratamiento. Si así lo hiciera, no recibirá ningún tipo de sanción o pérdida de beneficios y podrá ser atendido por una persona encargada de la atención médica que actualmente trabaja en su localidad y recibir el tratamiento normal en este establecimiento de salud según las indicaciones del médico. No perderá los beneficios ni los servicios que le corresponden.

#### Beneficios

Usted/su hijo (a)/su dependiente podría beneficiarse al formar parte de este estudio ya que se le hará examen de sangre para ver si tiene malaria a fin de asegurar que se le proporcione el tratamiento más apropiado. Existe la posibilidad que usted no tenga malaria y que el examen sea negativo. En ese caso, el médico le brindará el mejor cuidado y tratamiento disponibles. Esperamos que este estudio ayude al Ministerio de Salud del Perú a encontrar una mejor forma de diagnosticar la malaria y con ello permitir un tratamiento más adecuado.

#### Riesgos

Es probable que usted/su hijo (a)/su dependiente sienta un poco de dolor o de miedo mientras se toma la muestra de sangre de su dedo o su brazo pero normalmente no habrá infección.



**Confidencialidad**

Toda información relacionada con usted/su hijo (a)/su dependiente será almacenada en un lugar seguro en NAMRU-6 en Lima y sólo tendrán acceso a sus muestras e información los investigadores del estudio. Cualquier información sobre usted/su niño será mantenida confidencialmente en la medida en que la ley lo permita. Ningún informe de los resultados del estudio incluirá su nombre o datos que pudieran identificarlo. Se procederá a destruir (quemándolas) las muestras y la información del paciente cuando ya no sean necesarias.

**Resultados de los Estudios**

El establecimiento de salud le informará a usted/su hijo (a)/su dependiente de los resultados de las pruebas de microscopía por la clínica. A menos que lo solicite ningún otro resultado le será entregado debido a que estarán disponibles muchos meses después y es posible que en ese momento ya no les sean útiles desde el punto de vista clínico.

**Alternativas de participación**

La decisión de participar en este estudio es voluntaria, lo que significa que usted/su hijo(a)/su dependiente son libres de elegir si a usted/su hijo(a)/su dependiente le gustaría entrar al estudio. La alternativa suya o de su hijo(a) o de su dependiente es no participar en este estudio. En este caso, usted aún seguirá recibiendo el tratamiento médico estándar para la malaria y no perderá ningún beneficio al cual usted tiene derecho.

**Puntos de contacto**

Este consentimiento informado explica las actividades que planeamos hacer. Por favor háganos cualquier pregunta ahora si hay algo que no entienda. Usted puede también hacer preguntas en el futuro si lo desea. Si usted/su hijo(a)/su dependiente tuviera preguntas sobre este estudio, decidiera retirarse, o piensa que ha sufrido una lesión como resultado de su participación, por favor contacte a cualquiera de nuestros investigadores en este establecimiento de salud o dependiendo en qué área se encuentre, contacte a cualquiera de las siguientes personas:

- En Bellavista, Piura: Sra. Edith Guerrero Vínices, Centro de Salud Bellavista, celular 969958545.
- En Iquitos, Loreto: Dr. Salomón Durand, NAMRU-6, teléfono (065) 601471.
- En Tumbes: Dr. Rommel González Seminario, Dirección Regional de Salud Tumbes, teléfono: (072) 523032
- En Madre de Dios: Lic. Enf. Esteban Rivera, teléfono (082) 571126 Anexo 2200.
- En Lima: Dr. Juan Francisco Sanchez, teléfono: (01) 614-4141 Anexo 209.

Si usted tiene preguntas sobre sus derechos como participante en este estudio de investigación, usted puede contactar a:

- Dra. Giselle Soto, Presidenta del Comité de Ética de NAMRU-6, Lima, teléfono: (01) 6144106
- Sra. Roxana Lescano, Administradora del Comité de Ética de NAMRU-6 Lima, teléfono: (01) 6144139.

Esta copia es para sus registros.

La decisión de participar en este estudio es voluntaria, lo que significa que es libre de elegir si a usted/su hijo (a)/su dependiente le gustaría entrar al estudio. Usted puede rehusar participar o detener su participación en cualquier momento. No hay penalidades por retirarse del estudio.

Gracias por todo su tiempo y su asistencia.

CEI NAMRU-6 PERU N° de Protocolo: <u>NMRCD.2007.0004</u> Fecha de Aprobación: <u>20/08/12</u> Fecha de Expiración: <u>08/08/13</u> Verificado por: <u>ZM</u>
---

Detalles de la persona que administró el consentimiento informado:

Nombre y Apellido: \_\_\_\_\_ Firma: \_\_\_\_\_

Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_

CEI NAMRU-6  
PERU

N° de Protocolo: NMRCD.2007.0004

Fecha de Aprobación: 20/08/12

Fecha de Expiración: 08/08/13

Verificado por: ZM



**Consentimiento de Adulto:**

Mi firma abajo indica que yo he decidido participar en este estudio como sujeto de investigación y que el estudio me ha sido explicado, yo he tenido la oportunidad de hacer preguntas y sé que cualquier pregunta que tenga en el futuro será respondida por alguno de los investigadores del estudio y que yo entiendo la información presentada previamente. Yo entiendo que daré otra copia igual a este consentimiento informado.

Nombre y Apellido del Participante: \_\_\_\_\_

Firma del Participante: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_

Si el participante es analfabeto, un adulto debe testificar el proceso de consentimiento

Nombre y Apellido del Testigo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_

Firma del Testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_

**CONSENTIMIENTO DE PADRES:** Mi firma abajo indicará que yo he decidido permitir que mi hijo(a) participe en este estudio como un sujeto de investigación y que el estudio me ha sido explicado, he tenido la oportunidad de hacer preguntas y sé que cualquier pregunta que tenga en el futuro será respondida por alguno de los investigadores del estudio y que entiendo la información presentada previamente. Yo entiendo que daré otra copia igual a este consentimiento informado.

Nombre y Apellido del niño: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_

Nombre y Apellido del Padre o Guardia Legal: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_

Firma del Padre o Guardia Legal: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_

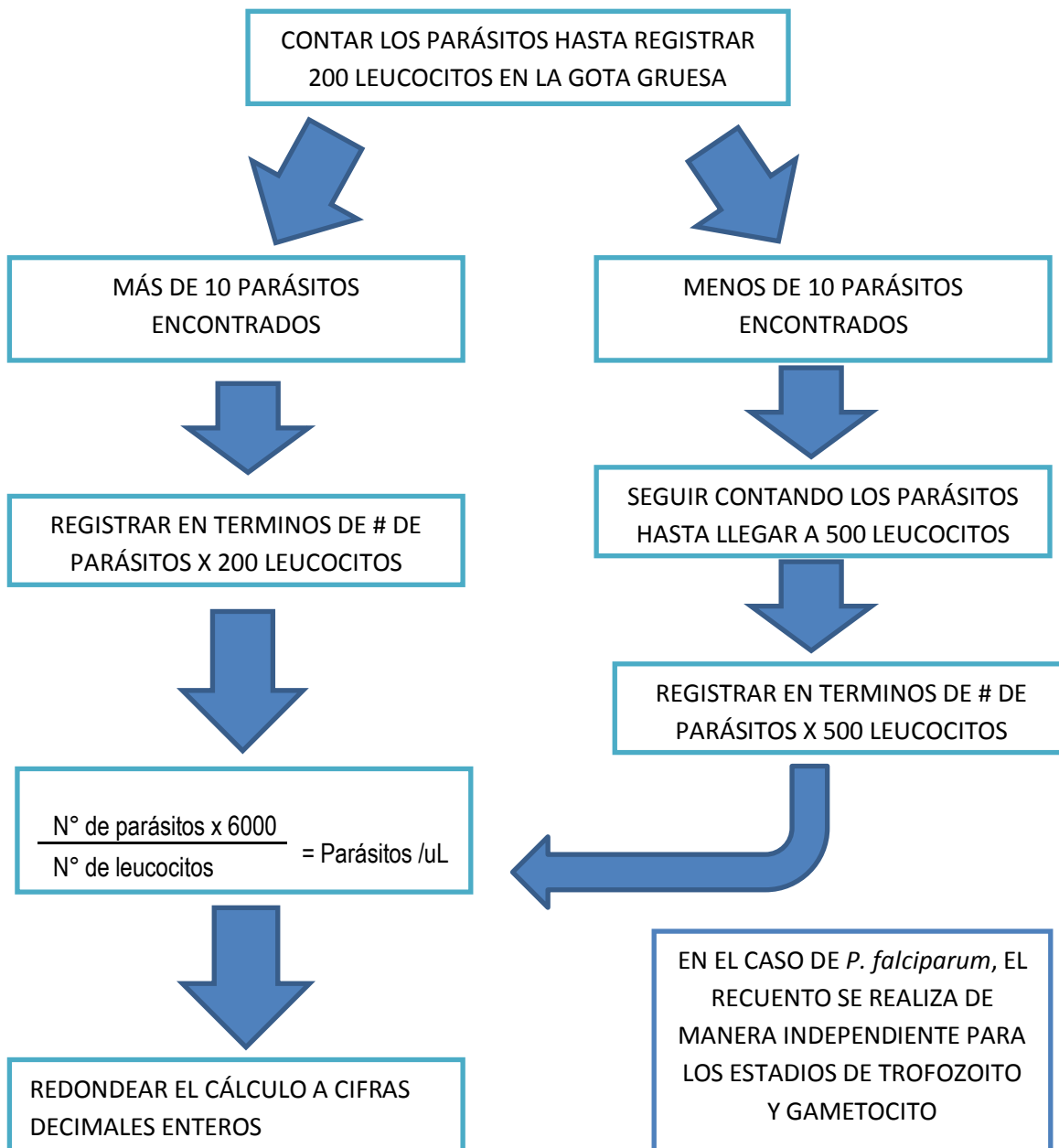
Si el padre o guardia legal es analfabeto, un adulto debe testificar el proceso de consentimiento

Nombre y Apellido del Testigo: \_\_\_\_\_ Edad: \_\_\_\_

Firma del Testigo: \_\_\_\_\_ Fecha: \_\_\_\_/\_\_\_\_/20\_\_\_\_

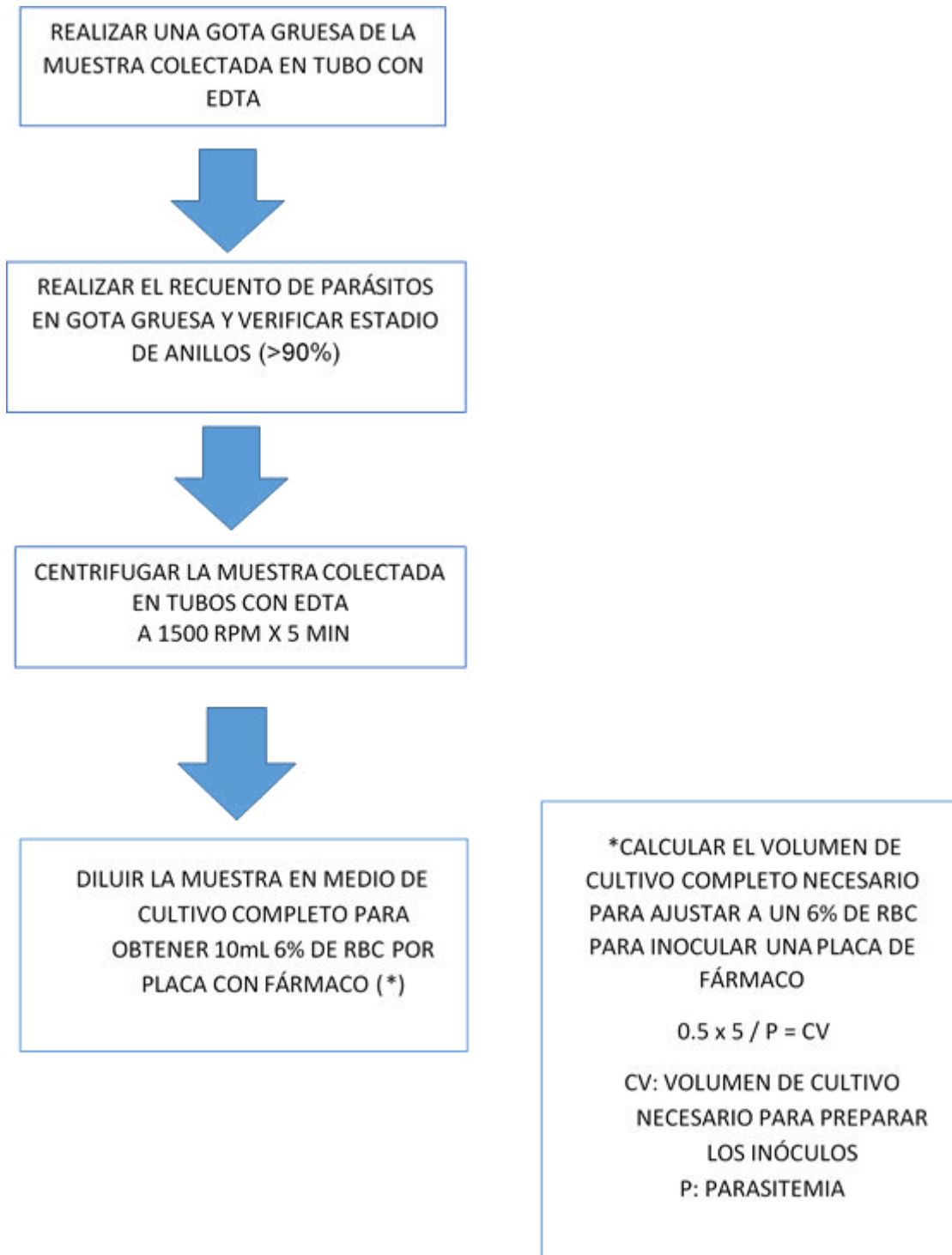
## ANEXO 4

### PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD PARASITARIA DE *Plasmodium falciparum*




## ANEXO 5

### AJUSTE DEL HEMATOCRITO



## ANEXO 6

**Cuadro N°1. Distribución de drogas según concentración**

DROGAS		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	CQ nM	2000	1000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.81	3.90	1.95	ctrol +
	CQ nM	2000	1000	500	250	125	62.50	31.25	15.63	7.81	3.90	1.95	ctrol +
	QN1 nM	2003.4	1001.70	500.85	250.43	125.21	62.61	31.30	15.65	7.83	3.91	1.96	ctrol +
	QN2 nM	2003.4	1001.70	500.85	250.43	125.21	62.61	31.30	15.65	7.83	3.91	1.96	ctrol +
	QN3 nM	2003.4	1001.70	500.85	250.43	125.21	62.61	31.30	15.65	7.83	3.91	1.96	ctrol +
	MQ1 nM	150	75	37.50	18.75	9.38	4.69	2.34	1.17	0.59	0.29	0.14	Blanco
	MQ2 nM	150	75	37.50	18.75	9.38	4.69	2.34	1.17	0.59	0.29	0.14	Blanco
	MQ3 nM	150	75	37.50	18.75	9.38	4.69	2.34	1.17	0.59	0.29	0.14	ctrol +
													
CONCENTRACIÓN (nM) DE MAYOR A MENOR													

## ANEXO 7

### INCUBACIÓN DE LA MUESTRA CON PARÁSITOS PARA LA REALIZACIÓN DE LOS ENSAYOS MSF Y DELI



## ANEXO 8

CENTRO MEDICO NAVAL DE INVESTIGACIÓN-6			
Ensayo inmuno - enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH)			
N6-PAR-IM	Fecha Efectiva: 23 de Marzo de 2015	Version: A	Página: 67 of 100
Autores: Lorena Tapia Responsable de autorización: Mark Simons Sección afectada: Parasitología - Inmunología			

### 1. FUNDAMENTO:

Esta prueba se fundamenta en un ensayo inmuno - enzimático de detección de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) usando anticuerpos monoclonales específicos para LDH de *P. falciparum*. La cuantificación del LDH malarial corresponde a la actividad de parásitos sobrevivientes a la acción de la droga. El nivel de LDHp liberado por el crecimiento del parásito es determinado por medidas de densidades ópticas (66).

### 2. MATERIALES

#### 2.1. Equipo y Suministros

- Gabinete de Bioseguridad Clase II
- Incubadora a 37 ° C
- Centrífuga
- Agitador Vortex
- Agitador
- Agitador magnético
- Colector de Vacuette de la lavadora
- Vaso de vidrio 1 l
- Espátula
- Balanza electrónica
- Pipeta de ayuda
- Micropipetas individuales: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Micropipeta multicanal: 300 µl
- Espectrofotómetro, BioTek Epoch Microplate Instruments
- Refrigerador
- Congeladores (-20 ° C, -80 ° C)

## **2.2. Reactivos**

- Anticuerpo monoclonal Pf LDH 19E4 (2,47 mg / ml, Vista)
- Anticuerpo monoclonal biotinilado anti-pLDH MAb 19G7 (2,7 mg / ml, Vista)
- Estreptavidina peroxidasa conjugada (S000-03, Rockland Inc.)
- 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidine (T5525, SIGMA)
- Dimetilsulfóxido (D8418, SIGMA)
- Ácido cítrico (C0759, SIGMA)
- Fosfato dibásico de sodio (S0876, SIGMA)
- Albúmina sérica bovina (A7030, SIGMA)
- Solución salina tamponada con fosfato (P3813, SIGMA)
- Ácido clorhídrico al 37% (100317, Merck)
- Agua destilada

## **2.3. Consumibles**

- Microtubos, 1.5 ml, 2 ml
- Tubos cónicos: 5 ml, 15 ml
- Pipetas serológicas: 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Extremidades de la micropipeta: 200 ul, 1ml
- Bote de plástico
- Sistema de esterilización de filtro (156-4020, Thermo Scientific)
- Tubos estériles de 4,5 ml
- Microplacas de 96 pocillos para el ensayo (NUNC Maxisorb)
- Depósito de tampón 50 ml
- Bata de laboratorio
- Guantes: nitrilo
- Papel de aluminio
- Tubos de extracción de sangre ACD, 3 ml

# **3. PROCEDIMIENTOS**

## **3.1. Revestimiento**

### **A. Para realizar el ensayo DELI a *P. falciparum***

- i. Escribir el nombre del experimento en un placa: "DELI Pf assay - (fecha) - (Iniciales)"
- ii. Preparar 12 ml de MAb Pf LDH 19E4 a 1 µg / ml.
  - a. Añadir 11995.14 µl de PBS a un tubo cónico de 15 ml.
  - b. Añadir 4.86 µl del MAb Pf LDH 19E4 (2.47 mg / ml) al tubo.
  - c. Agitar con el Vortex la dilución durante 30 segundos.

- iii. Verter la dilución en un depósito de amortiguación.
- iv. Agregar 100 µl por pocillo de la dilución, usando la micropipeta multicanal.
- v. Cubrir la placa con papel de aluminio y escribir el nombre de la placa en ella.
- vi. Incubar durante la noche a 4 ° C.
- vii. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y secar la placa con papel toalla.

### **3.2. Lavado**

- i. Agregar ~ 200 µl por pocillo de tampón de lavado (Sección 8.1.B), usando el colector Vacuette.
- ii. Esperar 1 minuto.
- iii. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero.
- iv. Secar la placa con una toalla de papel.
- v. Lavar la placa 4 veces más.

### **3.3. Bloqueo**

- i. Agregar 200 µl por pocillo de tampón de lavado (Sección 8.1.B), utilizando la micropipeta multicanal.
- ii. Cubrir la placa
- iii. Incubar durante 2 horas a temperatura ambiente.
- iv. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y seque la placa con papel toalla.
- v. Guardar la placa a 4 ° C por hasta 1 mes o continúe con la sección 7.4.

### **3.4. Preparación y detección de muestra**

Las muestras de placa proporcionadas contienen 100 µl de cepas de cultivo o muestras de campo diluidas con medio de cultivo al 2% de hematocrito. Estas placas se incuban y se mantienen congeladas a -80 ° C

- i. Hemolizar las muestras completando 3 ciclos congelados-descongelados. Realice este paso 1 hora antes de que finalice el bloqueo de la incubación o retire la placa del refrigerador (Sección 3.3.vi).
- ii. Transferir las muestras hemolizadas a la placa. Alternativamente, las muestras pueden diluirse si los resultados de OD son altos debido a la alta parasitemia.
- iii. Incubar durante 1 hora a 37 ° C en una cámara húmeda.
- iv. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y seque la placa con papel toalla.
- v. Lavar la placa como se describe en la sección 7.2



### **3.5. Biotinilado secundario AB**

- i. Preparar 12 ml del MAb 19g7 biotinilado en PBS a 0,1 µg / ml. Realice este paso 15 minutos antes de que finalice la incubación de la muestra (Sección 3.4.iii)
  - a. Añadir 11999,44 µl de PBS a un tubo cónico de 15 ml.
  - b. Añadir 0.56 µl del MAb pLDH 19g7 (2.7 mg / ml) al tubo.
  - c. Agitar con el Vortex la dilución durante 30 segundos.
- ii. Agregar 100 µl por pocillo de la solución Ab secundaria, utilizando la micropipeta multicanal.
- iii. Incubar durante 1 hora a 37 ° C en una cámara húmeda.
- iv. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y secar la placa con papel toalla.
- v. Lavar la placa como se describe en la sección 7.2

### **3.6. Estreptavidina-peroxidasa**

- i. Preparar 12 ml de estreptavidina-peroxidasa 1: 10000 en tampón de lavado. Realizar este paso 15 minutos antes de que finalice la incubación secundaria de Ab (Sección 3.5.iii)
  - a. Agregue 11998.8 µl de tampón de lavado a un tubo cónico de 15 ml.
  - b. Agregue 1,2 µl de la estreptavidina-peroxidasa al tubo.
  - c. Agite con el Vortex la dilución durante 30 segundos.
- ii. Agregar 100 µl por pocillo de la dilución (Sección 4.1.B), usando la micropipeta multicanal.
- iii. Incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- iv. Desechar la solución en la placa invirtiendo la placa rápidamente sobre el fregadero y seque la placa con papel toalla.
- v. Lavar la placa como se describe en la sección 7.2

### **3.7. Sustrato de peroxidasa**

- i. Preparar la solución de peroxidasa. Realice este paso 10 minutos antes de que finalice la incubación secundaria con Ab (Sección 3.6.iii)
  - a. Agregar 1 ml de DMSO a un tubo cónico de 15 ml, cúbralo con papel de aluminio.
  - b. Colocar una tableta de TMB a 1 mg en el tubo y con el agitador vortex hasta que se disuelva.
  - c. Agregar 9 ml de tampón fosfato-citrato y agite con el vortex durante 15 segundos.
- ii. Agregar 2 µl de peróxido de hidrógeno (30%) al tubo con el TMB diluido justo antes de realizar 7.7. iii

- iii. Agregar 100 µl por pocillo de TMB diluido, utilizando la micropipeta multicanal.
- iv. Incubar a temperatura ambiente. El tiempo de incubación es de 5 minutos para *P. vivax* y de 20 minutos para *P. falciparum*
- v. Detener la reacción mediante la adición de 100 µl de HCl 1N

### **3.8. Lectura de la placa**

- i. Conectar el cable del lector de placas a la computadora, y luego encienda ambos equipos.
- ii. Abrir el software del lector de placas y seleccione la plantilla para leer a 450 nm.
- iii. Colocar la placa en el lector y haga clic en la flecha verde para comenzar a leer.
- iv. Guardar la lectura en la carpeta DELI con el nombre de la placa
- v. Sacar la placa y apague el equipo.
- vi. Neutralizar el ácido en la placa agregando 100 µl de NaOH 1N

### **3.9. Análisis de placas**

- i. Exportar resultados en un archivo de Excel.
- ii. Transferir los datos al software GraphPad para calcular el valor IC50.

## **4. ADJUNTOS**

### **4.1. Preparación de tampones y soluciones**

#### **A. Solución salina tamponada con fosfato (PBS)**

- i. Disolver una bolsa de PBS (P3813, SIGMA) en 1 l de agua destilada.
- ii. Verter el tampón a través de la unidad de filtro y guárdelo a 4 ° C.

#### **B. Wash and blocking buffer (PBS-BSA)**

- i. Pesar 10 g de BSA (para BSA al 1%).
- ii. Diluir la BSA en 1 l de PBS.

#### **C. Tampón fosfato-citrato**

- i. Pesar 4.803 g de ácido cítrico, anhidro.
- ii. Pesar 7,098 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> anhidro.
- iii. Disolver los reactivos en 500 ml de agua destilada.
- iv. Verter el tampón a través de la unidad de filtro y guárdelo a 4 ° C.

#### **D. sustrato TMB**

- i. Cubrir un tubo cónico de 15 ml con papel de aluminio.

- ii. Agregar 1 ml de DMSO en el tubo cónico.
- iii. Disolver una tableta TMB en el DMSO mediante agitación vertical.
- iv. Agregar 9 ml de tampón fosfato-citrato.
- v. Agregar 2 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inmediatamente antes de usar.

#### **E. Detener solución**

- i. Agregar 37.5 ml de agua destilada a un tubo cónico de 50 ml
- ii. En una campana extractora, agregar 12.5 ml de HCl 37% (stock)

### **5. BIBLIOGRAFIA**

**Druilhe P, Moreno A, Blanc C, Brasseur PH, Jacquier P.** A colorimetric *in vitro* drug sensitivity assay for *Plasmodium falciparum* based on a highly sensitive double-site Lactate Dehydrogenase antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Am J Trop Med Hyg* 2001, 64(5, 6): 233–241

**Druilhe P, Brasseur P, Blanc C, Makler M.** Improved Assessment of *Plasmodium vivax* Response to Antimalarial Drugs by a Colorimetric Double-Site Plasmodium Lactate Dehydrogenase Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(6): 2112–2116

## ANEXO 9

CENTRO MEDICO NAVAL DE INVESTIGACIÓN-6			
Ensayo de fluorescencia para Malaria basado en el reactivo SYBR Green-I (MSF)			
N6-PAR-IM	Fecha Efectiva: 11 de Noviembre de 2016	Version: A	Página: 73 of 100
Autores: Lorena Tapia Responsable de autorización: Mark Simons Sección afectada: Parasitología - Inmunología			

### 1. FUNDAMENTO:

Esta prueba se fundamenta en un ensayo de fluorescencia de detección de ácido desoxirribonucleico (ADN) de *P. falciparum* presentes en la muestra. El fluorocromo que está presente en el reactivo SYBR presenta afinidad intercalante a los pares de bases G-C presentes en el ADN de *P. falciparum*. La cuantificación del ADN corresponde a la actividad de parásitos sobrevivientes a la acción de la droga ya que la muestra es filtrada previamente al ensayo para la eliminación del ADN de glóbulos blancos. El nivel de ADN liberado por el crecimiento del parásito es cuantificado en unidades relativas de fluorescencia (RFU) por fluorometría.

### 2. EQUIPOS Y SUMINISTROS

#### 2.1. Equipo y Suministros

- Gabinete de Bioseguridad Clase II
- Incubadora a 37 ° C
- Centrífuga
- Agitador Vortex
- Agitador
- Agitador magnético
- Colector de Vacuette de la lavadora
- Vaso de vidrio 1 l
- Espátula
- Balanza electrónico
- Pipeta de ayuda
- Micropipetas individuales: 10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl y 1000 µl
- Micropipeta multicanal: 300 µl
- Microlector de placas de Elisa GENios Fluorescence
- Refrigerador

- Congeladores (-20 ° C, -80 ° C)
- Baño de ultrasonido

## **2.2. Reactivos**

- Etanol
- Agua destilada
- Cloroquina (6)
- Quinina (QN)
- Mefloquina (MQ)
- Medios completos
  - RPMI
  - HEPES
  - Bicarbonato de sodio
  - Albumax / plasma inactivado
- Tampón de lisis
  - TRIS
  - EDTA
  - Saponina
  - Triton-X
  - SYBR Green

## **2.3. Consumibles**

- Microtubos, 1.5 ml, 2 ml
- Tubos cónicos: 5 ml, 15 ml
- Pipetas serológicas: 5 ml, 10 ml, 25 ml
- Extremidades de la micropipeta: 200 µl, 1ml
- Bote de plástico
- Sistema de esterilización de filtro (156-4020, Thermo Scientific)
- Tubos estériles de 4,5 ml
- Microplacas de 96 pocillos para el ensayo (NUNC Maxisorb)
- Depósito de tampón 50 ml
- Bata de laboratorio
- Guantes: nitrilo
- Papel de aluminio
- Tubos de extracción de sangre ACD, 3 ml

### 3. PROCEDIMIENTOS DE PREPARACIÓN DE PLACAS PRE-DOSIFICACION DE FÁRMACOS

#### 3.1. Preparación de las placas de pre-dosificación del fármaco

i. Pesar 5 mg de cada fármaco (CQ, QN y MQ)

Agregar los fármacos a un tubo con 5 ml de etanol al 70%, disuelva los líquidos mediante un agitador vórtex y el baño ultrasónico hasta que los fármacos se hayan disuelto.

ii. Diluir las medicinas en la concentración final adecuada con agua destilada, como se ve en la Tabla N ° 1.

Tabla N ° 1

Droga	Cloroquina	Quinina	Mefloquina
Concentration final(nM)	<b>2000</b>	<b>2003.4</b>	<b>150</b>

iii. Para obtener la concentración final, considerar el peso molecular de cada fármaco que podría variar.

iv. Considerar la tabla N ° 2 para calcular la concentración final requerida.

Tabla N° 2

Droga	Cloroquina	Quinina	Mefloquina
Dilución Inicial	5mg + 5ml EtOH70%	5mg+ 5ml Et OH70%	5 mg + 5ml Et OH70%
Dilución 1	200µl + 3676 µl dH2O	160 µl + 3840 µl dH2O	80ml + 392 µl dH2O
Dilución 2	600 µl + 2400ul dH2O	1250 µl + 1943. <sup>75</sup> µl dH2O	124.44 µl + 3875. <sup>557</sup> µl dH2O
<b>Concentracion final(nM)</b>	<b>2000</b>	<b>2003.4</b>	<b>150</b>

Después de obtener la concentración final de los fármacos

v. Agregar 240 µl de las soluciones de fármaco a la primera columna (N ° 1) de una placa de 96 pocillos

vi. Para comenzar la dilución administrar el programa diluidor N ° 27-3

vii. Realizar diluciones sucesivas 1: 2 hasta la columna 11. La columna 12 se usa en blanco (ejecute el programa dilutor N ° 28-4)

viii. Agregar 12 µl de los fármacos diluidos de la placa anterior a una nueva, en las mismas posiciones (ejecute el programa diluidor N ° 29-5.12)

- ix. Dejar las placas sin cubrir durante la noche para secar las soluciones de drogas añadidas
- X. Cubrir las placas y golpéelos con papel de aluminio; los puso dentro de una bolsa con desecante
- xi. Enviar las placas al campo a 4 ° C, guárdelas a -80 ° C a su llegada hasta su uso en 2 semanas

## **4. PROCEDIMIENTOS PREPARACIÓN MUESTRA CONFIGURACIÓN DE ENSAYO**

### **4.1. Configuración del ensayo de muestra**

- I. Contar la parasitemia y verifique que la mayoría de los parásitos (> 90%) se encuentren en la etapa de anillo.
- II. Calcular el volumen de cultivo y el volumen de medio completo (Sección 6.1.A) con un 6% de RBC necesarios para inocular la placa de fármaco, usar la siguiente fórmula:

$$0.5 \times 5 / P = CV$$

CV: volumen de cultivo necesario para preparar los inóculos

P: Parasitemia

- III. Centrifugar la muestra de sangre fresca recogida en tubos de EDTA a 1500 RPM durante 5 minutos
- IV. Diluir el CV en medio completo con 6% de RBC, hasta un volumen de 5 ml. Siga diluyendo agregando 10 ml de medio completo.
- V. Agregar 100µl a cada pocillo en la placa de fármaco.
- VI. Mezclar suavemente y dispense 100 µl en cada pocillo de la placa de predosis del fármaco..
- VII. Incubar a 37°C con vela durante 70 a 72 horas, encendiendo la vela cada 12 horas
- VIII. Congelar la placa a -80 ° C y envíe de vuelta al laboratorio en hielo seco
- IX. Almacenar a -80 ° C hasta que se lea.

## **5. PROCEDIMIENTOS ENSAYO DE MSF**

### **5.1. Estudio de la placa**

- i. Descongelar las placas llevándolas a temperatura ambiente durante al menos 2 horas

- ii. Preparar aproximadamente 10 ml de tampón de lisis (Sección 6.1.B),) con SYBR Green para cada placa
- iii. Agregar 2 µl de SYBR Green por mililitro de tampón de lisis (mantener protegido de la luz)
- iv. Agregar 100 l de tampón de lisis - SYBR Green a cada pocillo, utilizando el sistema de pipeteo BioTek Precision™ Microplate
- v. Incubar a temperatura ambiente durante 24 horas, mantenerlo protegido de la luz
- vi. Leer la fluorescencia de los pocillos de la placa a 485 nm en el lector de placas

## **5.2. Interpretación**

- i. Trazar los resultados del lector de placas usando el software GraphPad Prism 4 v4.03 y calcule el IC50 para cada fármaco.

## **6. ADJUNTOS**

### **6.1. Preparación de búferes y soluciones**

#### **A. Preparación de medios completos**

- I. Reconstituir un sobre de RPMI 1640 en 1 L de agua destilada.
- II. Agregar 5.94 g de HEPES. Filtrar esterilizar con filtro de 0,2 micras.
- III. Añadir 10 ml de suero humano O + o solución de Albumax (5 g disueltos en 100 ml de RPMI + HEPES, y esterilizar por filtración)
- IV. Agregar 1,6 ml de solución de bicarbonato sódico.

Nota: usar este medio solo por dos semanas.

#### **B. Preparación del tampón de lisis**

- I. Colocar 1 microfiltro litro de agua destilada, colóquelo en un agitador con un imán de agitación.
- II. Agregar 15.76 g de Tris.HCl y disuelva completamente (por 100 mM). Ajuste el pH a 7.5
- III. Agregar 20 ml de EDTA 0,5M o 3,722 g de EDTA-dihidrato y disuelva por completo (por 10 mM)
- IV. Agregar 160 mg de saponina (para 0.016% p / v)
- V. Agregar 16 ml de Triton-X (para 1.6% v / v)
- VI. Hacer un vacío para filtrar la mezcla y eliminar cualquier partícula. Debido al contenido de detergente, la filtración vigorosa produce burbujas.

Nota: Este buffer puede almacenarse a temperatura ambiente.



## 7. BIBLIOGRAFIA

**Vossen MG, Pferschy S, Chiba P, Noedl H.** The SYBR Green I Malaria Drug Sensitivity Assay: Performance in Low Parasitemia Samples. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010;82(3):398-401.

**Druilhe P, Brasseur P, Blanc C, Makler M.** Improved Assessment of *Plasmodium vivax* Response to Antimalarial Drugs by a Colorimetric Double-Site Plasmodium Lactate Dehydrogenase Antigen Capture Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *Antimicrob Agents Chemother* 2007, 51(6): 2112–2116

## ANEXO 10

### AUTORIZACIÓN DEL USO DE DATOS

04 de enero de 2018

Magister  
Carmen Cecilia Muñoz Barbarino  
Directora  
Escuela Profesional de Tecnología Médica  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Estimada Mg. Muñoz:

ASUNTO: "AUTORIZACION DE USO DE DATOS"

Tengo el agrado de dirigirme a usted, como jefa de Departamento de Parasitología del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6), para hacer de su conocimiento que la Srta. Maribel Tello Sánchez con código No 07010450, alumna de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Escuela Profesional de Tecnología Médica cuenta con autorización para el uso de datos de muestras que la Srta. Tello procesó durante su rotación en nuestra institución. Estos datos forman parte del protocolo titulado: "Distribución de la malaria en el Perú" NAMRU6.2007.0004, estudio observacional, el cual cuenta con la aprobación del Comité de Ética del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Marina de los Estados Unidos (NAMRU-6).

Los datos del estudio en referencia serán utilizados para la tesis de pre-grado de la Srta. Tello quien tendrá como co-asesora a la Lic. Laura Lorena Tapia Torres del NAMRU-6 y a la Lic. Pilar Alva Betalleluz como asesora de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos.

Agradeciéndole la atención a la presente, me despido de usted.

Muy atentamente,



DANETT K. BISHOP  
Teniente Primero, MSC, USN  
Jefa del Departamento de Parasitología  
NAMRU-6

## ANEXO 11 RESULTADOS ENSAO DELI

REGISTRO DE RESULTADOS DE LAS MUESTRAS												
MUESTRA	CÓDIGO	FECHA	RESULTADO DELI (IC50)									
			CQ	QN	MQ	ÉXITO DEL CALCULO IC50	ANALISIS DE CURVAS (R2)			CV DE LECTURAS		
			X IC50	X IC50	X IC50		CQ	QN	MQ	<20%	>20%	
1	301-037	12-Ago-15	308.10	39.35	44.02	SI	0.8535	0.8253	0.989		X	NO
2	MDP 4262	12-Ago-15	156.75	65.49	6.4445	SI	0.963	0.952	0.977	X		SI
3	301-033	20-Ago-15	143.90	96.98	7.158	SI	0.9504	0.9901	0.9402		X	NO
4	MDP 4239	20-Ago-15	244.00	85.64	8.247	SI	0.9566	0.956	0.9923	X		SI
5	301-039	21-Ago-15	98.91	98.77	14.93	SI	0.9672	0.9656	0.9934	X		SI
6	301-044	21-Ago-15				NO				X		SI
7	301-053	28-Ago-15	175.15	74.77	5.758	SI	0.9454	0.9963	0.9945	X		SI
8	301-058	28-Ago-15	228.85	83.42	8.9545	SI	0.9454	0.9768	0.9904	X		SI
9	301-051	28-Ago-15	257.95	126.4	9.9595	SI	0.9598	0.9954	0.9989	X		SI
10	301-054	28-Ago-15	83.01	100.93	26.785	SI	0.9495	0.9797	0.9905	X		SI
11	301-049		664.40	113.8	26.13	SI	0.6768	0.5776	0.5346	X		SI
12	301-056		201.60	117.35	13.94	SI	0.9329	0.9481	0.9919	X		SI
13	301-059		143.75	74.455	4.604	SI	0.9755	0.9925	0.9924	X		SI
14	MDP 3860		351.97	188.25	34.7	SI	0.5184	0.7248	0.8042		X	NO
15	MDP 3874		64.79			NO	0.8237			X		SI
16	MDP 3894		345.80	150.8	12.78	SI	0.9617	0.9931	0.9963	X		SI

## ANEXO 12 RESULTADOS ENSAO MSF

REGISTRO DE RESULTADOS DE LAS MUESTRAS												
MUESTRA	CÓDIGO	FECHA	RESULTADO MSF (IC50)									
			24H									
			CQ	QN	MQ	ÉXITO DEL CALCULO IC50	ANALISIS DE CURVAS (R2)			CV DE LECTURAS		
			IC50 24H	IC50 24H	IC50 24H		CQ	QN	MQ	<10%	>10%	
1	301-037		226.5	103.14	14.055	SI	0.919	0.9932	0.7811		X	NO
2	MDP 4262	12-ago-15	0.84	211.2		NO	0.026	0.5308		X		SI
3	301-033	20-ago-15	255.3			NO	0.243			X		SI
4	MDP 4239	20-ago-15	231.6	120.6	3.825	SI	0.9537	0.9804	0.9533		X	NO
5	301-039	21-ago-15	156.53	75.35	227.9	SI	0.8404	0.9892	0.8753	X		SI
6	301-044	21-ago-15				NO				X		SI
7	301-053	28-ago-15	296.4	87.53		NO	0.8087	0.9222			X	NO
8	301-058	28-ago-15	184.35	130.45		NO	0.9404	0.9912		X		SI
9	301-051	28-ago-15	337.9	253.9		NO	0.922	0.9275			X	NO
10	301-054	28-ago-15	50.46	93.09	3.488	SI	0.9439	0.9872	0.5807		X	NO
11	301-049		281.15	186.6	6.511	SI	0.9627	0.9954	0.7259		X	NO
12	301-056		170.5	66.29	11.17	SI	0.9482	0.9941	0.9516		X	NO
13	301-059		249.1	153.2		NO	0.916	0.9894		X		SI
14	MDP 3860		302	235.85	10.402	SI	0.9354	0.9831	0.647		X	NO
15	MDP-3874		434.6	181.1		NO	0.3750	0.9518			X	NO
16	MDP 3894		235.55	96.095	3.22	SI	0.9724	0.9891	0.5826		X	NO

**Imagen N° 1** Provincia de Maynas en el departamento de Loreto.



Imagen N° 2 Distrito de Punchana en la provincia de Maynas.

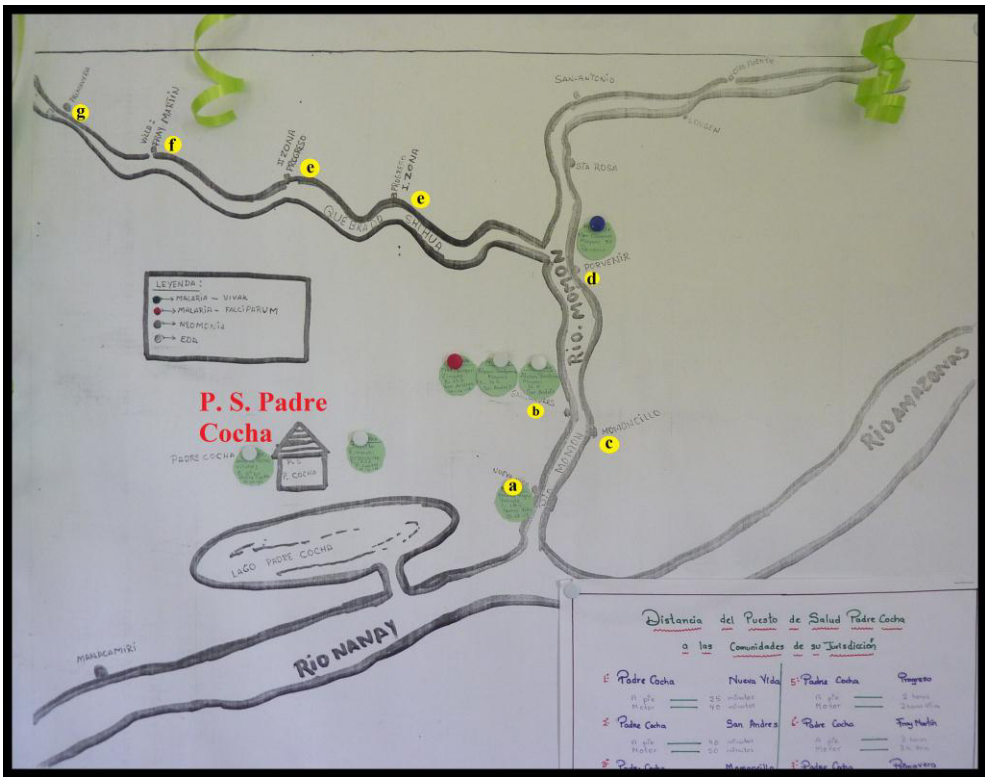
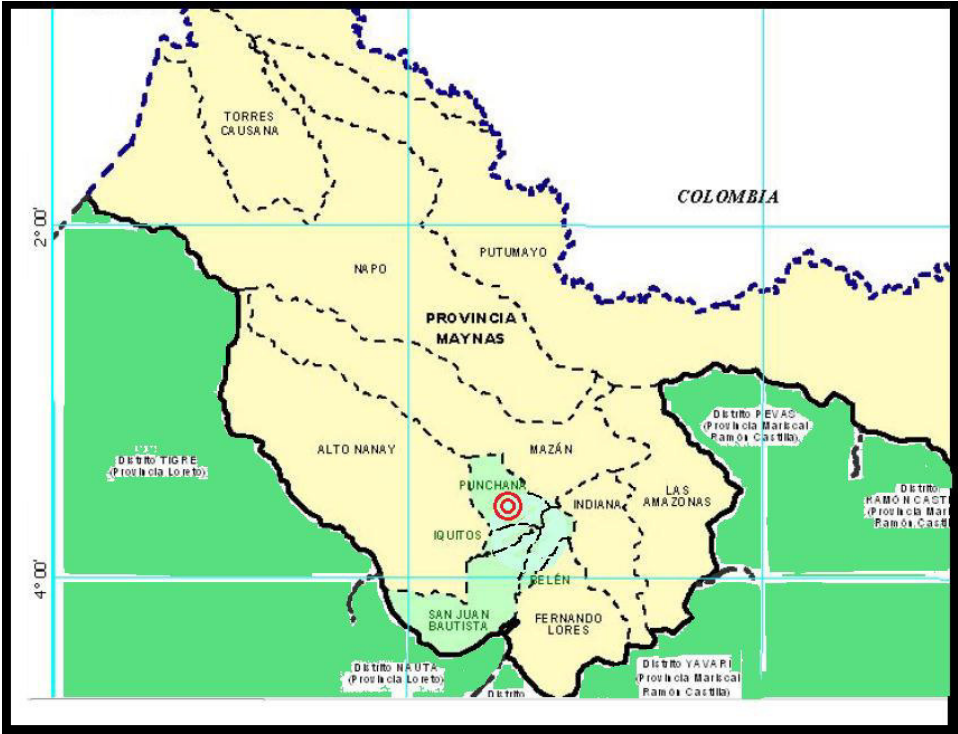


Imagen N° 3 Las 7 comunidades del distrito de Punchana que acudían al Puesto de Salud Padre Cocha: a)Nuevas Vida, b)San Andres, c)Momoncillo, d)Porvenir, e)Progreso, f)Fray Martin, g)Primavera.

